

Stoffwechselstörungen
im Krebs-Henseleit-Zyklus:
Hyperargininämie
und Argininosuccinatacidurie.
Bestimmung der Arginase-
und Argininosuccinase-Aktivität mit
L-(guanido)¹⁴C-Argininmonohydrochlorid

R. Schaller

*Liss
München
1966*



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus der Haunerschen Kinderklinik der Universität

München

Direktor: Prof.Dr.med. H.B.Hadorn

Stoffwechselstörungen im Krebs-Henseleit-Zyklus:

Hyperargininämie und Argininosuccinatacidurie.

Bestimmung der Arginase- und Argininosuccinase-

Aktivität mit L-(guanido)¹⁴C-Argininmonohydrochlorid

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin

an der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

R.Schaller

aus

Landshut

1986

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof.Dr.med. W. Endres

Mitberichterstatter: Prof.Dr.med. H.B. Hadorn

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Frau Dr. Y.S. Shin

Dekan: Prof.Dr.med. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 27.05.1986

INHALTSVERZEICHNIS

1.	<u>EINLEITUNG</u>	1
1.1	Geschichte und Physiologie des Krebs- Henseleit-Zyklus	1
1.2	Enzymdefekte im Harnstoffzyklus und ihre klinische Symptomatik	4
1.2.1	Carbamoylphosphat-Synthetase I-Defekt oder congenitale Hyperammonämie Typ I	4
1.2.2	Ornithintranscarbamylase-Defekt oder Hyperornithinämie	4
1.2.3	Defekt der Argininosuccinatsynthetase oder Hypercitrullinämie	5
1.2.4	Defekt der Argininosuccinase oder Argininosuccinatacidurie	5
1.2.5	Arginase-Defekt oder Hyperargininämie	6
1.3	Sekundäre Hyperammonämien als wichtigste Differentialdiagnose zu Enzymdefekten im Harnstoffzyklus	7
1.3.1	Störungen des Transports von Harnstoff- zyklusmetaboliten	7
1.3.2	Organische Azidurien	7
1.3.3	Sonstige Ursachen	7
1.4	Ausweichwege zur Beseitigung von Ammoniak bei Vorliegen eines Enzymdefektes im Harnstoffzyklus	8
1.4.1	Die Glutamatdehydrogenase	8
1.4.2	Die Glutaminsynthetase	8
1.5	Fragestellung	9
2.	<u>PATIENTEN</u>	10
2.1	Patient 1	10
2.2	Patient 2	12

3.	<u>MATERIAL</u>	13
3.1	Gewebs- und Zellproben	13
3.2	Chemikalien	14
4.	<u>METHODIK</u>	15
4.1	Probenvorbereitung	15
4.1.1	Präparation der Erythrozyten	15
4.1.2	Präparation der Leukozyten	15
4.1.3	Präparation der Amnionzellen und Fibroblasten	15
4.1.4	Präparation der Gewebeproben aus Leber, Niere, Gehirn, Milz und Duodenum	16
4.2	Prinzip der Anwendung des Radioisotopen L-(guanido) ¹⁴ C-Argininmonohydrochlorid im Meßvorgang	16
4.2.1	Arginasemessung	16
4.2.2	Argininosuccinasemessung	17
4.3	Testansatz zur Messung der Enzymaktivität	17
4.3.1	Arginasebestimmung	17
4.3.2	Argininosuccinasebestimmung	18
4.4	Säulenchromatographie	18
4.4.1	Säulenchromatographische Trennung von Harnstoff und Arginin im Arginasemeßtest	19
4.4.2	Säulenchromatographische Trennung von Argininosuccinat und Arginin im Argininosuccinasemeßtest	19
4.5	Flüssigkeits-Szintillationszähler	22
4.6	Berechnung der Enzymaktivitäten	22
4.7	Erstellung der Kinetik	22
4.7.1	Enzymkinetik der Arginase	23
4.7.2	Enzymkinetik der Argininosuccinase	23
4.8	Protein- und Hb-Messung	23

5.	<u>ERGEBNISSE</u>	24
5.1	Patient 1	24
5.2	Patient 2	24
5.3	Kinetische Eigenschaften	27
5.3.1	Arginase-Kinetik	27
5.3.2	Argininosuccinase-Kinetik	27
6.	<u>DISKUSSION</u>	37
6.1	Testansatz	37
6.1.1	Argininosuccinase-Messung	37
6.1.2	Arginase-Messung	38
6.1.3	Die Verwendung des Radioisotopen L- (guanido) ¹⁴ C-Argininmonohydrochlorid	38
6.2	Arginaseaktivität	39
6.3	Argininosuccinaseaktivität	41
6.4	Kinetik	42
6.5	Anwendung der entwickelten Enzymmeß- methoden in der pränatalen Diagnostik	43
6.6	Therapie von Hyperargininämie und Argininosuccinatacidurie	44
7.	<u>ZUSAMMENFASSUNG</u>	46
8.	<u>LITERATUR</u>	48
9.	<u>LEBENS LAUF</u>	59

1. EINLEITUNG

1.1 Geschichte und Physiologie des Krebs-Henseleit-Zyklus

Der Abbau von Aminosäuren im Organismus führt zur Entstehung von toxischem Ammoniak. Dessen endgültige Beseitigung findet - wie Bollmann bereits im Jahre 1924 zeigte - hauptsächlich in der Leber statt (72).

Autoren wie Ratner und Petrack (64), Reichard, Soriano, Tedesco und Mellmann zeigten in den darauf folgenden Jahren, daß auch andere Organe in geringen Mengen zur Harnstoffsynthese befähigt sind (72).

Es sind dies vor allem Niere, Gehirn sowie Erythrozyten, Leukozyten, Fibroblasten und Amnionzellen.

Durch den Harnstoffzyklus entsteht der für den Organismus wesentlich weniger giftige Harnstoff.

Dieser wiederum kann leicht über die Nieren ausgeschieden werden.

Im Jahre 1932 postulierten erstmals Krebs und Henseleit, daß die Harnstoffsynthese in einem zyklischen Stoffwechselweg ablaufen müsse (72).

Cohen et al. konnten 1960 zeigen, daß der erste Schritt im Harnstoffzyklus von dem mitochondrialen Enzym Carbamoylphosphat-Synthetase I katalysiert wird:

Dabei entstehen aus Ammoniak, Bikarbonat und 2 ATP 1 Mol Carbamoylphosphat und 2 ADP:

Abb. 1:



Die irreversibel ablaufende Reaktion benötigt die Anwesenheit von Acetylglutamat. Dieses entsteht in den Mitochondrien mit Hilfe der Acetylglutamatsynthetase aus AcetylCoA und Glutamat:

Abb. 2:



Aus Carbamoylphosphat und Ornithin wird im zweiten Schritt des Harnstoffzyklus unter der Einwirkung der ebenfalls mitochondrialen Ornithintranscarbamylase Citrullin gebildet:

Abb. 3:



Diese reversible Enzymreaktion wurde erstmals beschrieben von Joseph et al. 1963 (39).

Den dritten und vierten Teil des Stoffwechselkreises konnten Ratner und Petrack im Jahre 1953 nachzeichnen (64).

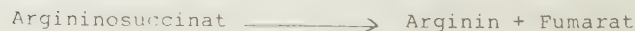
Mit Hilfe der Argininosuccinatsynthetase entsteht aus Citrullin, Aspartat und ATP Argininosuccinat und AMP:

Abb. 4:



Diese Reaktion findet im Gegensatz zu den drei ersten Reaktionsschritten des Harnstoffzyklus nicht in den Mitochondrien, sondern im Zytosol statt. Sie ist außerdem umkehrbar. Im vierten Reaktionsschritt wird Argininosuccinat von der Argininosuccinase gespalten in Fumarat und Arginin:

Abb. 5:



Auch diese Reaktion ist reversibel und findet im Zytosol statt. Besondere Bedeutung gewinnt diese Reaktion dadurch, daß Fumarat Stoffwechselmetabolit des Zitratzyklus ist. Es wird so zum Bindeglied zwischen zwei wichtigen Stoffwechselkreisen.

Der letzte Stoffwechselschritt im Krebs-Henseleit-Zyklus führt zur Spaltung des Arginins in Harnstoff und Ornithin. Die von der Arginase katalysierte Reaktion ist irreversibel und findet im Zytosol statt.

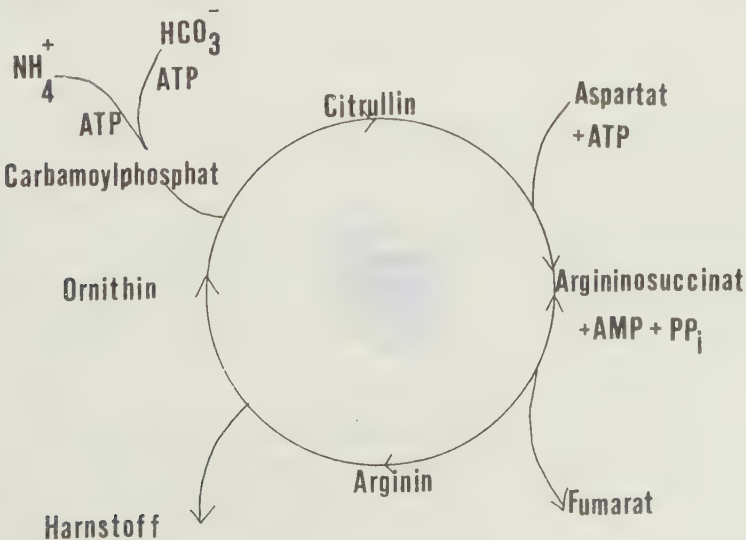
Abb. 6:



An dieser Stelle schließt sich der Stoffwechselkreis. Harnstoff kann ausgeschieden werden, Ornithin reagiert erneut mit Carbamoylphosphat zu Citrullin.

Damit ergibt zusammenfassend der Harnstoffzyklus folgendes Bild:

Abb. 7:



1.2 Enzymdefekte im Harnstoffzyklus und ihre klinische Symptomatik

1.2.1 Carbamoylphosphat-Synthetase I-Defekt oder congenitale Hyperammonämie Typ I

Das autosomal rezessiv vererbte Krankheitsbild wurde erstmals von Freeman et al. (30) im Jahre 1964 beschrieben. Seitdem sind laut Walser (88) noch 24 Fälle bekannt geworden. Im Mittelpunkt der klinischen Symptomatik stand stets eine starke Hyperammonämie, jeweils wenige Tage nach der Geburt auftretend. Sie wiederum verursachte episodisches Erbrechen, Krämpfe, Apathie, muskuläre Hypotonie, aber auch Spastizität. Hinzu kamen eine Ketoazidose und Dehydratation.

Im Urin dieser Patienten fand sich eine Hyperacidurie, im Blut eine Erhöhung der Aminosäuren und der Transaminasen. Der Serumharnstoffspiegel war im Normalbereich.

Unter proteinarmer Diät verbesserte sich zwar der Zustand der Patienten, doch verstarben alle entweder noch in der Neonatalzeit oder aber im Alter von wenigen Monaten.

1.2.2 Ornithintranscarbamylase-Defekt oder Hyperornithinämie

Der X-chromosomal gebundene Enzymdefekt, 1962 erstmals beschrieben von Russell et al. (68), zeigt bei den betroffenen Kindern ebenfalls eine ausgeprägte Hyperammonämie (57). Seit-her sind noch über 100 Fälle aufgetreten (88).

Die Hyperammonämie tritt entweder sofort nach der Geburt oder aber erst im Kleinkindalter als sogenanntes "late onset syndrome" auf. Das männliche Geschlecht ist wegen des X-chromosomal rezessiven Erbgangs deutlich schwerer betroffen (57). Das klinische Bild wird auch bei diesem Defekt von der Hyperammonämie bestimmt.

Die Patienten entwickeln wiederholtes Erbrechen, Bewußtlosigkeit, geistige und körperliche Retardierung, eine cerebrale Rindenatrophie, irregulären Nystagmus, sowie eine respiratorische Alkalose.

Im Blut dieser Patienten zeigt sich eine unspezifische Erhöhung der Aminosäuren und Transaminasen.

Der Serumharnstoff liegt im Normbereich.

Die hemizygoten weiblichen Patienten leiden gelegentlich an dem partiellen Enzymdefekt, leben unter proteinarmer Diät jedoch relativ problemlos. Die männlichen Patienten mit in der Regel totalem Stoffwechselblock versterben oft bald nach der Geburt. Bei beiden Geschlechtern kommen jedoch auch gegenteilige Verlaufsformen vor.

1.2.3 Defekt der Argininosuccinatsynthetase oder Hypercitrullinämie

Dieser autosomal rezessiv verursachte Enzymdefekt kommt besonders häufig in Japan vor. Die Hypercitrullinämie wurde erstmals von Mc Murray 1962 beschrieben (53).

Auch hier tritt charakteristischerweise eine Hyperammonämie auf. Die Serum- und Urinkonzentrationen von Citrullin waren bei allen Patienten stark erhöht.

Das klinische Bild ist geprägt von gesteigerter Irritabilität, Erbrechen, Apathie, Obstipation, geistiger und körperlicher Retardierung sowie Spastik, Krämpfen und Apnoeanfällen. Der Krankheitsverlauf - bisher sind ca. 50 Fälle bekannt - nimmt schon in den ersten Lebensmonaten einen letalen Ausgang.

1.2.4 Defekt der Argininosuccinase oder Argininosuccinacidurie

Der autosomal rezessiv vererbte Defekt der Argininosuccinase wurde erstmals von Allan et al. 1958 (1) beschrieben. Seither folgten etwa 60 weitere Fälle.

Dieser Stoffwechseldefekt hat in den USA eine Inzidenz von 1:70000 (88).

Die Patienten zeigten nicht immer eine Hyperammonämie, jedoch Hepatomegalie, komatöse Zustände, Spastik, cerebellare Ataxie, brüchige Haare (Trichorrhexis nodosa), sowie geistige und körperliche Retardierung. Ebenso wurden periorbitale Ödeme, epileptiforme Anfälle, Hypothermien, Ikterus, sowie metabolische Azidosen und Alkalosen beobachtet (9,20,34,35,45,71). In Urin, Blut und cerebrospinaler Flüssigkeit zeigte sich eine starke Argininosuccinatanreicherung (14).

Die Literatur (24,33) unterscheidet drei Typen:

- den neonatalen Typ mit oft frühzeitig letalem Ausgang.
- den infantilen Typ mit Einsetzen der Symptomatik in den ersten Lebensmonaten.
- den chronischen Typ mit Erkrankungsbeginn im zweiten Lebensjahr.

1.2.5 Arginase-Defekt oder Hyperargininämie

Der autosomal rezessive Stoffwechseldefekt wurde erstmals beschrieben von Terheggen et al. (80) im Jahre 1969. Von den bisher insgesamt 13 beschriebenen Fällen waren laut Literatur (88) über die Hälfte Kinder mittelamerikanischer Einwanderer spanischer Abstammung in Mexiko und Puerto Rico.

Eine Hyperammonämie ist nicht zwingend zu beobachten, eine Anhäufung von Arginin, Lysin, Zystin, Citrullin und Ornithin im Harn kommt vor. In Blut und cerebrospinaler Flüssigkeit ist die Argininkonzentration stark erhöht. Ebenso kommt es zu einem Anstieg der Serumtransaminasen.

Das klinische Bild wird beherrscht von komatösen Zuständen, epileptiformen Anfällen, Spastizität, sowie allgemeiner geistiger und körperlicher Retardierung. Hinzu kommen Hypermotilität, Hepatomegalie, Erbrechen, Tremor, Ataxie, Choreoathetose und cerebrale Atrophie (23,50,81,88).

Die Erkrankung endet meist schon im frühen Kindesalter letal.

1.3 Sekundäre Hyperammonämien als wichtigste Differentialdiagnose zu Enzymdefekten im Harnstoffzyklus

Von den primären Hyperammonämien, die durch Enzymdefekte im Harnstoffzyklus verursacht werden, sind die sekundären Hyperammonämien differentialdiagnostisch abzugrenzen.

Sie seien hier nur kurz aufgelistet (modifiziert nach Bachmann (5)):

1.3.1 Störungen des Transports von Harnstoffzyklusmetaboliten

- Lysinurische Proteinintoleranz
- Hyperornithinämie-Homocitrullinurie-Hyperammonämie Syndrom.

1.3.2 Organische Azidurien

- Isovaleriansäure Azidurie
- Methylcrotonylglycinurie
- 3-Methyl-3-Hydroxyglutaraturie
- Propionsäure Azidurie
- Methylmalonsäure Azidurie

1.3.3 Sonstige Ursachen

- transiente Hyperammonämie des Frühgeborenen (6,10,59,82)
- Reye's Syndrom
- Gefäßmißbildungen
- Valproattherapie
- unspezifische Leberinsuffizienz

1.4 Ausweichwege zur Beseitigung von Ammoniak bei Vorliegen eines Enzymdefektes im Harnstoffzyklus

Dem menschlichen Organismus stehen im wesentlichen zwei Ausweichwege zur Beseitigung von Ammoniak zur Verfügung. Diese sind allerdings nicht in der Lage, den Harnstoffzyklus und seine Stoffwechselleistung zu ersetzen:

1.4.1 Die Glutamatdehydrogenase

Die Glutamatdehydrogenase bildet unter Verbrauch von Ammoniak aus Alpha-Ketoglutarat die Aminosäure Glutamat:

Abb. 8:



1.4.2 Die Glutaminsynthetase

Die Glutaminsynthetase führt wiederum unter Verbrauch von Ammoniak zur Entstehung von Glutamin:

Abb. 9:



Die Carbamoylphosphatsynthetase II, ein zytosolisches Enzym, benötigt Glutamin zur Herstellung von Pyrimidinen.

1.5 Fragestellung

Im Jahre 1983 wurden unabhängig voneinander zwei Patienten mit primärer Hyperammonämie in die Universitätskinderklinik im Hauner'schen Kinderspital bzw. in die Universitätspoliklinik aufgenommen.

Dabei zeigte ein Kind zusätzlich eine Hyperargininämie, das andere zusätzlich eine Argininosuccinatacidurie.

Daraus ergab sich die Aufgabe, eine neue Enzymmeßmethode zu entwickeln, die folgende Vorteile gegenüber den bisherigen Verfahren bietet:

- Die Messung der Arginase- wie der Argininosuccinase-aktivität erfolgt mit Hilfe ein und desselben Substrates, nämlich L-(guanido)¹⁴ C-Argininmonohydrochlorid. Aufwendige enzymatische Mehrfachreaktionen, wie sie bei photometrischen Messungen erforderlich sind, entfallen.
- Die neue Methode ermöglicht eine sichere enzymatische Diagnostik. Die Messung der radioaktiven Zerfallsrate des umgesetzten Substrates ist unabhängig von Farbumschlagsreaktionen und bietet daher eine gleichermaßen hohe Sensitivität und Spezifität.
- Die gleichzeitige Messung von Probenmaterial aus verschiedenen Organen ist möglich, ohne das Meßgerät ständig neu justieren zu müssen.
- Die neue Methode ist in ihrem Meßbereich nicht so eingeschränkt wie das bei photometrischen Verfahren der Fall ist. Eine Abhängigkeit von Absorptionsmaxima, Lichtfiltern oder Spektrallinien ist bei der neuen Meßmethode nicht gegeben.
- Durch den gleichzeitigen Ablauf der Enzymaktivitätsmessung mit verschiedenen hohen Substratmengen ermöglicht die neue Methode die Erstellung einer Enzymkinetik.
- Der zeitlich und methodisch günstige Aufbau der neuen Methode ermöglicht einen eventuellen Einsatz in der pränatalen Diagnostik.

2. PATIENTEN

2.1 Patient 1:

Ein 6 Monate alter männlicher Säugling zeigte bei Klinikaufnahme folgende Symptomatik: Porenzephalie, starke cerebrale Lähmungserscheinungen (spastische Tetraplegie), neuromotorischen Entwicklungsrückstand, subdurale Ergüsse, Hirndrucksteigerung, zunehmendes Erbrechen;

Gewicht: 6180 g, Länge: 63 cm, Kopfumfang: 43,2 cm.

Der Patient wurde als 3. Kind gesunder, nicht blutsverwandter Eltern geboren. Die beiden Geschwister waren ebenfalls gesund. Die Geburt des Kindes erfolgte in der 37. Schwangerschaftswoche wegen placenta praevia durch eine sectio caesarea. Geburtsgewicht: 2950 g, Apgar: 9/9/9. Im Alter von 1 Woche verschlechterte sich der Allgemeinzustand des Patienten und bald darauf erfolgten erste Krampfanfälle. Im Alter von 3 Monaten zeigte der Patient eine deutliche muskuläre Hypertonie, darüberhinaus wurde eine starke geistige und körperliche Retardierung erkennbar. Ein routinemäßiges Screening ergab einen Ammoniakspiegel von 700 µg/100 ml Blut (normal in diesem Alter 45 bis 110 µg/100 ml Blut (81)) sowie eine Argininkonzentration von 695 µmol/l Plasma (normal in diesem Alter 53 bis 73 µmol/l Plasma (17)). Ebenfalls erhöht waren die Transaminasen: GOT 65,0 U/l, GPT 60,1 U/l, Gamma-GT 63,9 U/l. Der Glutaminspiegel lag bei 1,001 µmol/ml Plasma (normal in diesem Alter 0.05 bis 0.4 µmol/ml Plasma (15)).

Die Diagnose lautete somit: Hyperargininämie und Hyperammonämie. Während der Behandlung mit einer proteinarmen Diät von 0,7 g/kg KG/Tag (UCD I, Fa.Milupa, Gemisch essentieller Aminosäuren nach dem Muster der Frauenmilch) erniedrigten sich die Arginin- und Ammoniak-Blutspiegel auf Normalwerte (Abb. 10). Der Rest des Eiweißbedarfs wurde durch natürliches Eiweiß (0,5 g/kg KG/Tag) gedeckt. Der Zustand des Patienten besserte sich zwar, der Entwicklungsrückstand blieb jedoch erhalten. Im Alter von 11 Monaten hatte der Säugling hohes Fieber und verstarb zu Hause vermutlich an hypertotonischer Dehydratation.

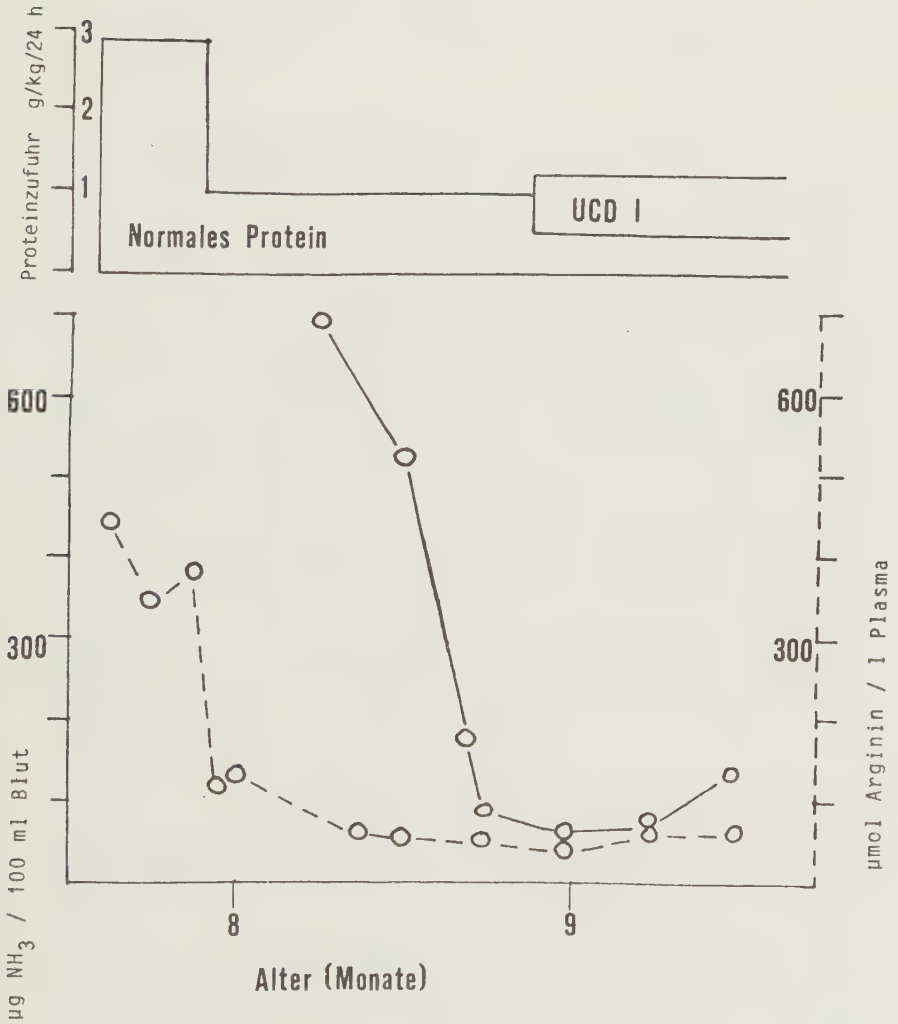


Abb. 10: Auswirkungen der Diätbehandlung auf die Ammoniak- und Arginin-Blutspiegel des Patienten 1.

2.2 Patient 2:

Ein 5 Tage alter weiblicher Säugling zeigte folgende klinische Erscheinungen:

Starke Krämpfe, aufgetriebenes Abdomen, Knöchelödeme, schwere Dyspnoe, Schockzustand.

Das Kind wurde als zweite Tochter nicht blutsverwandter Eltern geboren. In der Familie waren bisher keine schweren Erkrankungen oder Stoffwechselstörungen aufgetreten.

Die Geburt erfolgte spontan in der 39. Schwangerschaftswoche aus einer vorderen Hinterhauptslage und nahm einen vollkommen normalen Verlauf. Das Neugeborene wies alle erforderlichen Reifezeichen auf. Geburtsgewicht: 3560 g, Länge: 50 cm, Kopfumfang: 34 cm, Apgar 10.

Am 5. Lebenstag trat eine plötzliche Verschlechterung des Allgemeinzustandes auf. Das Kind hatte ein auffallend fahles Aussehen, war dyspnoisch und ikterisch (Bilirubin gesamt: 18 mg%, Bilirubin direkt: 2 mg%). Das Abdomen wirkte pastös und aufgetrieben. Laboruntersuchungen ergaben eine Hyperammonämie von 700 µg/100 ml Blut (normal in diesem Alter 45 bis 110 µg/100 ml Blut (81)) sowie eine starke Ausscheidung von Argininbernsteinsäure und seiner beiden Anhydride im Urin: Argininbernsteinsäure: 0.675 µmol/ml (0.19 g/l).

Argininbernsteinsäureanhydrid I: 1.890 µmol/ml (1.05 g/l).

Argininbernsteinsäureanhydrid II: 8.511 µmol/ml (4.74 g/l).

Die Gesamtausscheidung der Argininbernsteinsäure im Urin des Kindes betrug demnach 11.07 µmol/ml bzw. 5.98 g/l (normal: 0).

Im Säulenchromatogramm der Urinamino-säuren des Kindes war außerdem die Ausscheidung von Taurin, Glycin und Citrullin deutlich erhöht.

Das Kind verstarb bereits am 8. Lebenstag, nachdem der Blut-ammoniakspiegel trotz mehrfacher Blutaustauschtransfusionen bis auf 2000 µg/100 ml angestiegen war.

3. MATERIAL

3.1 Gewebe- und Zellproben

Frisches Autopsiematerial wurde vom gerichtsmedizinischen Institut der Universität München zur Verfügung gestellt. Zwischen dem Zeitpunkt des Todeseintritts und der Sektion lag stets ein Zeitraum von nicht mehr als 6 Stunden. Das Lebensalter der Verstorbenen, die als Kontrollen dienten, lag zwischen 20 und 50 Jahren. Sie alle waren eines unnatürlichen Todes gestorben und hatten an keinerlei Stoffwechselkrankheiten gelitten.

Amnionzellen kamen aus der I. Frauenklinik der Universität München, Fibroblasten aus dem Institut für physiologische Chemie der Universität München.

Kontrollen von Erythrozyten und Leukozyten stammten von gesunden Probanden, in der Regel Mitarbeitern der Haunerschen Kinderklinik der Universität München.

Probenmaterial der Patienten kam aus der Haunerschen Kinderklinik der Universität München bzw. der Universitätspoliklinik München.

3.2 Chemikalien

Der radioaktive Testbestandteil, L-(guanido)¹⁴ C-Arginin-monohydrochlorid wurde von Amersham Buchler, Braunschweig bezogen.

L-Arginin kam von Carl Roth, Karlsruhe.

Fumarat wurde hergestellt von Fluka AG Buchs, SG, Schweiz.

Eine Reihe von Chemikalien wie Glycin, MnCl_2 , KH_2PO_4 , EDTA, Na-Citrat, NaOH stammten von E.Merck, Darmstadt.

Weitere technisch-chemische Hilfsmittel waren:

Dowex AG 50 W x 8 von Sigma Chemie München.

Szintillator: Quickszint 402, Fluoreszenzmaximum 415 nm
Zinsser Frankfurt.

4. METHODIK

4.1 Probenvorbereitung

4.1.1 Präparation der Erythrozyten

Heparinisiertes Vollblut wurde zentrifugiert und die dabei gewonnenen Erythrozyten mehrfach mit physiologischer Kochsalzlösung gewaschen. Anschließend wurden sie bis zum Gebrauch bei -20°C eingefroren. Für den Test wurden die Erythrozyten nach dem Auftauen mit aqua dest. 1:4 verdünnt.

4.1.2 Präparation der Leukozyten

Vollblut wurde mit Leukozytenlösung (5 g Dextran, 0.7 g NaCl, 50 mg Heparin auf 100 ml aqua dest.) durchmischt, nach 1 Stunde bei Raumtemperatur der Überstand abgehoben und zentrifugiert.

Das entstandene Leukozytensediment wurde sodann mit 0.1 % Essigsäure 30 sek. aufgeschüttelt und mit 0.7 % NaCl gewaschen. Nach 15-minütigem Zentrifugieren wurde bei -20°C eingefroren. Zum endgültigen Gebrauch wurden die Leukozyten nach Zugabe von 200 μl aqua dest. sonifiziert und nochmals zentrifugiert.

4.1.3 Präparation der Amnionzellen und Fibroblasten

Das Zellmaterial wurde nach Bebrütung bei 37°C mehrfach mit physiologischer Kochsalzlösung gewaschen, zentrifugiert und bei -20°C eingefroren. Für den endgültigen Gebrauch wurden die Zellen nach Auftauen und Zugabe von 200 μl aqua dest. sonifiziert und zentrifugiert.

4.1.4 Präparation der Gewebeproben aus Leber, Niere, Gehirn, Milz und Duodenum

Konnten die Gewebeproben nicht sofort verwendet werden, so wurden sie bei -20°C eingefroren und für den Test wieder aufgetaut.

Sodann wurden die Gewebsstücke unter Eiskühlung in einem Potter-Elvehjem-Homogenisator mit aqua dest. 1:6 homogenisiert und mehrmals bei 10 000 g zentrifugiert.

Der Überstand wurde für den Enzymtest je nach Art des zu untersuchenden Probenmaterials nochmals mit aqua dest. verdünnt:

Arginasetest:

Leber: 1:100, Niere 1:10, Gehirn 1:10

Argininosuccinasetest:

Leber: 1:40, Niere: 1:4, Gehirn: 1:2, Milz: 1:2, Duodenum: 1:2.

4.2 Prinzip der Anwendung des Radioisotopen L-(guanido) ^{14}C -Argininmonohydrochlorid im Meßvorgang

4.2.1 Arginasemessung

Die Arginase katalysiert, wie in der Einleitung geschildert, folgende Reaktion:

Abb. 11:

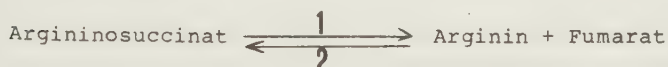
Arginin $\longrightarrow$ Harnstoff + Ornithin

Ersetzt man nun das Substrat Arginin durch das radioaktiv markierte L-(guanido) ^{14}C -Argininmonohydrochlorid, so kann man über die Bestimmung des entstandenen radioaktiven Produktes Harnstoff die Aktivität der Arginase ermitteln. Dazu ist es nötig, den radioaktiv markierten Harnstoff vom radioaktiv markierten Substrat ^{14}C -Arginin zu trennen. Dies geschieht mit Hilfe der Säulenchromatographie. Anschließend kann im Szintillationszähler die radioaktive Zerfallsrate bestimmt werden.

4.2.2 Argininosuccinase-messung

Die Argininosuccinase katalysiert die Reaktion:

Abb. 12:



Die Reaktion läuft in beiden Richtungen ab. Durch Einsatz von ^{14}C -Arginin und Fumarat im Überschuß kann man die Reaktion in Richtung 2 ablaufen lassen.

Danach trennt man das radioaktiv markierte Produkt Argininosuccinat vom radioaktiv markierten ^{14}C -Arginin mit Hilfe der Säulenchromatographie. Im Szintillationszähler kann sodann wieder die radioaktive Zerfallsrate bestimmt werden.

4.3 Testansatz zur Messung der Enzymaktivität

4.3.1 Arginasebestimmung

Unter Eiskühlung wurde in ein Eppendorf-Gefäß das zu untersuchende Probenmaterial (10 μl) und 20 μl Gemisch aus 0.05 M MnCl_2 und 0.1 M GlycinNaOH pH = 9.5 zu gleichen Teilen gegeben.

Nach einer 30-minütigen Aktivierung bei 56°C in einem Thermoblock wurde die Reaktion durch Zugabe von 30 μl Substrat gestartet. Die Substratmenge enthielt jeweils 15 μl L-(guanido) ^{14}C -Argininmonohydrochlorid (0.015 $\mu\text{Ci}/3 \mu\text{mol}$). Die anschließende Inkubationszeit bei 37°C im Thermoblock richtete sich je nach Art des zu untersuchenden Probenmaterials:

Erythrozyten: 10 min, Leukozyten: 120 min

Fibroblasten und Amnionzellen: 180 - 240 min

Leber: 20 min, Niere: 60 min, Gehirn: 60 min.

Nach Abbruch der Reaktion durch Hitzeinaktivierung bei 95°C für 3 - 5 min. wurde abzentrifugiert und der Überstand für die säulenchromatographische Trennung verwendet.

Bei den Leerwerten wurde nicht inkubiert, sondern gleich hitzeinaktiviert.

4.3.2 Argininosuccinasebestimmung

Zunächst wurde ein Substratgemisch zu je gleichen Mengenanteilen hergestellt aus: KH_2PO_4 (0.2 M) gepuffert mit EDTA (0.2 M) auf pH = 7.0, Fumarat (0.2 M) ebenfalls gepuffert auf pH = 7.0, L-(guanido) ^{14}C -Argininmonohydrochlorid (10 $\mu\text{Ci/ml}$), L-Arginin (10 mM).

Zu jeweils 30 μl dieses Substratgemisches in einem Eppendorfgeläß wurden zunächst unter Eiskühlung 30 μl Probenmaterial gegeben. Danach wurde bei 37°C in der Thermoplatte inkubiert. Die Inkubationszeit wurde auch hier von der Art des Probenmaterials bestimmt:

Leber: 20 min, Niere: 60 min, Gehirn: 60 min, Milz: 60 min, Duodenum: 60 min.

Erythrozyten: 30 min.

Im Anschluß daran wurde die Reaktion durch Hitzedenaturierung bei 95°C für 5 - 10 min beendet. Der zentrifugierte Überstand wurde für die Säulenchromatographie weiterverwendet.

Die Leerwerte wurden ohne Inkubation sofort inaktiviert.

4.4 Säulenchromatographie

Mini-Säulen, deren Boden mit einem Plättchenfilter versehen war, wurden mit ca. 1 cm^3 Dowex AG 50 Wx8 (200 - 400 mesh) gefüllt. Das sandkornförmige Medium Dowex wurde vor der Beschichtung der Säulen folgendermaßen behandelt:

Ca 500 g Dowex wurden in einem Glaszylinder mit ca. 1 l aqua dest. und 1 N HCl für 10 min. vermischt. Danach wurde ausgiebig mit mehreren Litern aqua dest. gespült.

Im zweiten Schritt wurde etwa 1 l 1 N NaOH zugegeben und nach weiteren 10 min. wiederum mit mehreren Litern aqua dest. nachgewaschen.

Das so vorbereitete Dowex wurde bis zum Testgebrauch bei 4°C aufbewahrt und dann auf Zimmertemperatur erwärmt.

4.4.1 Säulenchromatographische Trennung von Harnstoff und Arginin im Arginase-Mess-Test.

Die Dowex gefüllten Mini-Säulen wurden zunächst mit 2.5 ml 0.2 N NaCitrat pH = 3.0 äquilibriert.

Danach wurden jeweils 30 µl des hitzedenaturierten, zentrifugierten Überstandes aus dem Testansatz auf die Säulen geschichtet. Anschließend wurde das Produkt ^{14}C -Harnstoff in 3 Fraktionen mit je 1 ml 0.2 N NaCitratpuffer pH = 3.0 eluiert. Dabei wurde jede aus den Säulen abtropfende Fraktion in einem Einmalmeßgefäß (vial) für die Messung im Flüssigkeits-Szintillator aufgefangen (Abb. 13).

4.4.2 Säulenchromatographische Trennung von Argininosuccinat und Arginin im Argininosuccinase-Mess-Test

Analog zum Arginasetest wurden die Dowex-gefüllten Mini-Säulen mit 2.5 ml 0.2 N NaCitrat pH = 3.0 äquilibriert. Ebenso wurden wiederum 30 µl hitzedenaturierten und zentrifugierten Überstandes auf die Säulen geschichtet. Diesmal wurden jedoch die ersten 3 Fraktionen - wieder mit je 1 ml 0.2 N NaCitrat pH = 3.0 eluiert - verworfen. Grund: Bei pH = 3.0 liegt das Optimum für die Eluierung von Harnstoff. Beim Argininosuccinasetest jedoch interessiert das radioaktiv markierte Argininosuccinat. Dessen Elutionsoptimum liegt bei pH = 6.5. Daher wurde im Anschluß an die ersten 3 Fraktionen 4mal mit je 1 ml 0.3 N NaCitrat pH = 6.5 eluiert. Diese 4 Fraktionen wurden wiederum in einem Einmalmeßgefäß (vial) aufgefangen (Abb. 14).

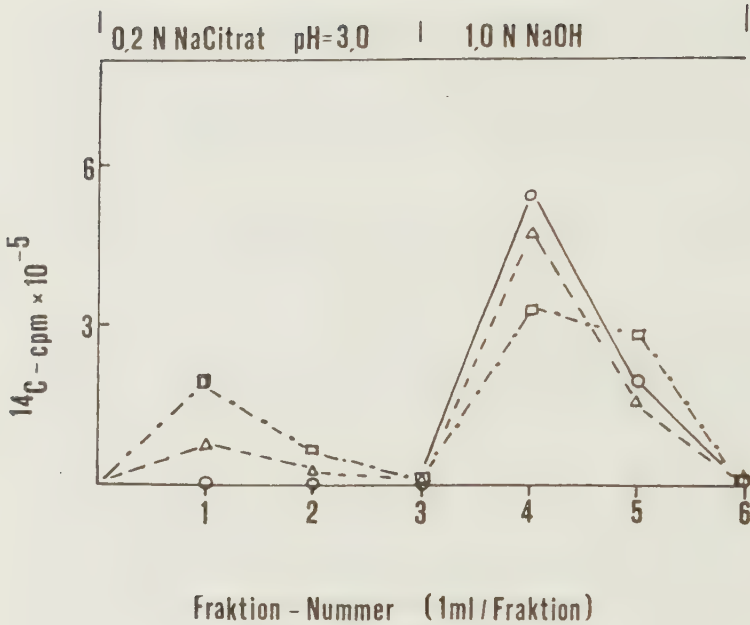


Abb. 13: Säulentrennung von ^{14}C -Harnstoff und ^{14}C -Arginin. Die Eluierung von Harnstoff erfolgte mit 3 Fraktionen 0,2 N NaCitrat pH=3,0, die Eluierung von Arginin mit 1,0 N NaOH.
 O = 0 min Inkubationszeit, Δ = 1 min Inkubationszeit, $\square$ = 5 min Inkubationszeit.

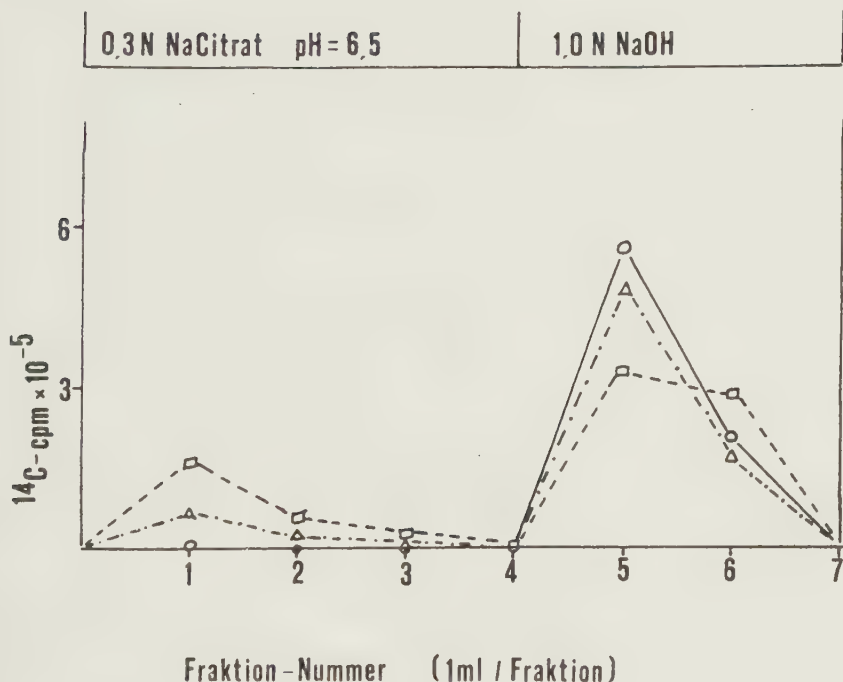


Abb. 14: Säulentrennung von ^{14}C -Argininosuccinat und ^{14}C -Arginin. Die Eluierung von Argininosuccinat erfolgte mit 4 Fraktionen 0,3 N NaCitrat pH = 6,5, die Eluierung von Arginin mit 1,0 N NaOH.

○ = 0 min Inkubationszeit, △ = 1 min Inkubationszeit, □ = 5 min Inkubationszeit.

4.5 Flüssigkeits-Szintillationszähler

Sowohl beim Arginasetest als auch beim Argininosuccinasetest wurden zu den Einmalmeßgefäßen (vials) mit dem Eluat jeweils 16 ml Quickszint-Szintillationsflüssigkeit zugegeben.

Danach wurde jedes vial 10 min. im Szintillator gezählt. Der "internal standard" des Gerätes zeigte eine Zählausbeute von ca. 85 %.

Der "external standard" wurde folgendermaßen bestimmt:

Um einen 100 % - Wert zu erhalten, wurden 30 µl des hitze-denaturierten und zentrifugierten Testansatzes nicht auf eine Säule geschichtet, sondern direkt in ein Einmalmeßgefäß pipettiert. Danach wurden jeweils die gleichen Mengen an Eluations- und Szintillationsflüssigkeit zugegeben wie bei den anderen Proben, um so gleiche Meßbedingungen im Szintillationszähler zu schaffen.

4.6 Berechnung der Enzymaktivitäten

Die Meßwerte werden angegeben in µmol/min bzw. nmol/min. Der Substratumsatz errechnet sich aus dem Produkt von relativer Zerfallsrate und absolut eingesetzter Substratmenge. Zu berücksichtigen war dabei noch der jeweilige Verdünnungsfaktor. Die so ermittelte Enzymaktivität wird bei Geweben und Zellen bezogen auf 1 mg Protein, bei Erythrozyten auf 1 g Hb.

4.7 Erstellung der Kinetik

Es wurden Lineweaver-Burk-Diagramme angefertigt und daraus die kinetischen Eigenschaften ermittelt:

- a) Die Michaelis-Menten-Konstante K_m . Sie drückt diejenige Substratmenge aus, bei der das Enzym zur Hälfte gesättigt ist. Sie ist damit ein Maß für die Affinität des Enzyms zum Substrat.
- b) V_{max} als Maß für die maximale Umsatzgeschwindigkeit bzw. die vollständige Sättigung des Enzyms mit Substrat.

4.7.1 Enzymkinetik der Arginase

Die K_m -Werte für Arginase wurden ermittelt mit Arginin-konzentrationen von 50.0, 25.0, 10.0, 5.0 und 2.5 mmol/l im Testansatz.

4.7.2 Enzymkinetik der Argininosuccinase

Für die K_m -Werte der Argininosuccinase wurden Arginin-konzentrationen von 1.25, 0.625, 0.375, 0.250 und 0.125 mmol/l im Testansatz verwendet.

4.8 Protein- und Hb-Messung

Die Proteinmessung erfolgte nach der Methode von Lowry. Die Hämoglobinmessung wurde mit der Cyanhämoglobinmethode bei 546 nm durchgeführt.

5. ERGEBNISSE

5.1 Patient 1:

Die Meßwerte für den Patienten 1 zeigt Tabelle 1.

Erythrozyten und Leukozyten des Patienten 1 ergaben eine fehlende bzw. herabgesetzte Arginaseaktivität im Vergleich zu den Kontrollwerten (Erythrozyten: $0 \mu\text{mol/min/g Hb}$, normal: 62.2 ± 28.4 , Leukozyten: $0.01 - 0.16 \mu\text{mol/min/mg Protein}$, normal: 1.4 ± 0.69).

Die spezifische Aktivität der Arginase in gesundem menschlichen Gewebe war am höchsten in der Leber mit Werten von ca. $1 - 10 \mu\text{mol/min/mg Protein}$. Die Niere zeigte eine Aktivität von $0.2 - 1.1 \mu\text{mol/min/mg Protein}$, das Gehirn $0.02 - 0.12 \mu\text{mol/min/mg Protein}$.

Eine niedrige, jedoch meßbare Arginaseaktivität konnte in gezüchteten Fibroblasten und Amnionzellen ermittelt werden: $1.6 - 4.1 \text{ nmol/min/mg Protein}$.

5.2 Patient 2:

Die Meßwerte der Argininosuccinase-Aktivität beim Patienten 2 zeigt Tabelle 2, die Meßwerte der Arginaseaktivität Tabelle 1. Die Aktivität in der Leber war wesentlich erniedrigt ($75 \text{ nmol/min/mg Protein}$, normal: ca. $300 \text{ nmol/min/mg Protein}$). Die Aktivität in der Niere zeigte einen nur geringen Unterschied zwischen Patient und Normalgewebe: $21.48 \text{ nmol/min/mg Protein}$, normal: $34.72 \pm 6.54 \text{ nmol/min/mg Protein}$. Ähnliche Meßwerte wie in der Niere ergaben sich auch für die Milz ($27.22 \pm 4.42 \text{ nmol/min/mg Protein}$) und das Duodenum ($33.67 \pm 1.52 \text{ nmol/min/mg Protein}$) des Patienten. Die Messung der Arginaseaktivität bei Patient 2 erbrachte Werte im unteren Normbereich.

Leber: $1.25 \pm 0.04 \mu\text{mol/min/mg Protein}$

Niere: $0.40 \pm 0.01 \mu\text{mol/min/mg Protein}$.

Tab. 1: Arginaseaktivität

Material	Aktivität
Erythrozyten	($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g Hb}$)
Patient 1	0
Kontrollen (n = 16)	$62.2 \pm 28.4^+$ $27.9 - 78.0^{++}$
Leukozyten	($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg Protein}$)
Patient 1	0.01, 0.16
Kontrollen (n = 5)	1.4 ± 0.69 $0.8 - 2.5$
Gewebe	($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg Protein}$)
Leber 1	9.62
Leber 2	6.25
Leber 3	2.03
Leber 4	1.72
Leber Patient 2	1.25 ± 0.04
Niere 1	1.15
Niere 2	0.88
Niere 3	0.32
Niere 4	0.24
Niere Patient 2	0.40 ± 0.01
Gehirn 1	0.12
Gehirn 2	0.08
Gehirn 3	0.027
Gehirn 4	0.022
Bebrütete Zellen:	($\text{nmol}/\text{min}/\text{mg Protein}$)
Amnionzellen (n = 4)	3.3, 3.8, 2.8, 2.0
Fibroblasten (n = 4)	1.6, 2.4, 4.1, 1.9

+ Mittelwert $\pm$

++ Bereich

Tab. 2: Argininosuccinaseaktivität

Material	Aktivität
Erythrozyten	(nmol/min/g Hb)
Patient 2	-
Kontrollen (n = 4)	118.25 $\pm$ 36.53 ⁺ 62.18 - 160 ⁺⁺
Gewebe	(nmol/min/mg Protein)
Patient 2	
Leber	75.0 $\pm$ 1.41 74.0 - 76.0
Niere	21.48 $\pm$ 2.23 19.90 - 23.06
Milz	27.22 $\pm$ 4.42 22.31 - 29.43
Duodenum	33.67 $\pm$ 1.52 32.59 - 34.75
Gewebe	
Kontrollen (n = 4)	(nmol/min/mg Protein)
Leber	273 $\pm$ 38.72 240 - 350
Niere	34.72 $\pm$ 6.54 30.09 - 39.35
Gehirn	8.96 $\pm$ 3.14 6.06 - 12.10
+ Mittelwert $\pm$	
++ Bereich	

5.3 Kinetische Eigenschaften

5.3.1 Arginase-Kinetik

Die Arginase-Kinetik zeigen die Abb. 15, 16 und 17. Die Lineweaver-Burk-Diagramme für die Arginase liefen bei allen Geweben linear. Die Michaelis-Menten-Konstante K_m betrug ca. 10.0 mmol/l für alle gemessenen Proben. Die Affinität für Arginin war also relativ niedrig.

Tabelle 3 zeigt die Werte für K_m und v_{max} der Arginase.

5.3.2 Argininosuccinase-Kinetik

Die Argininosuccinase-Kinetik zeigen die Abb. 18, 19, 20 und 21.

Das Lineweaver-Burk-Diagramm für die Argininosuccinase verlief ebenfalls für alle Gewebe linear.

Die Michaelis-Menten-Konstante K_m bewegte sich im Bereich von 0.3 - 0.5 mmol/l.

Beim Patientengewebe lagen die K_m -Werte jedoch wesentlich höher:

Leber: 10 mmol/l, Niere, Milz und Duodenum: 3.5 - 5.0 mmol/l.

Tabelle 4 zeigt die Werte für K_m und v_{max} der Argininosuccinase.

Tab. 3: Kinetik der Arginase

Material	$v_{\max}$ ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g Hb}$)	K_m (mmol/l)
Erythrozyten		
Patient 1	0	0
Kontrollen (n = 16)	300	10.0 - 12.2
Leukozyten	$v_{\max}$ ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg Prot}$)	K_m (mmol/l)
Kontrollen (n = 5)	1.44	8.3 - 11.2

Gewebe (n = 4)	$v_{\max}$ ($\text{nmol}/\text{min}/\text{mg Prot}$)	K_m (mmol/l)
Leber	51.56	8.3 - 10.0
Niere	47.61	9.1 - 10.0
Gehirn	1.0	10.0
Bebrütete Zellen (n = 4)	$v_{\max}$ ($\text{nmol}/\text{min}/\text{mg Prot}$)	K_m (mmol/l)
Amnionzellen	8.8	11.1
Fibroblasten	6.6	8.3

Tab. 4: Kinetik der Argininosuccinase

Material	$v_{\max}$ (nmol/min/g Hb)	K_m (mmol/l)
Erythrozyten		
Patient 2	-	-
Kontrollen (n = 4)	350	1.0

Gewebe	$V_{\max}$	K_m (mmol/l)
Patient 2		
Leber	26.04 μ mol/min/mg Prot.	10.0 - 20.0
Niere	49.40 nmol/min/mg Prot.	3.5
Milz	3.54 nmol/min/mg Prot.	3.5
Duodenum	196.00 nmol/min/mg Prot.	5.0

Gewebe	$v_{\max}$ (nmol/min/mg Prot)	K_m (mmol/l)
Kontrollen (n = 4)		
Leber	86.45	0.33
Niere	21.34	0.36
Gehirn	15.15	0.50

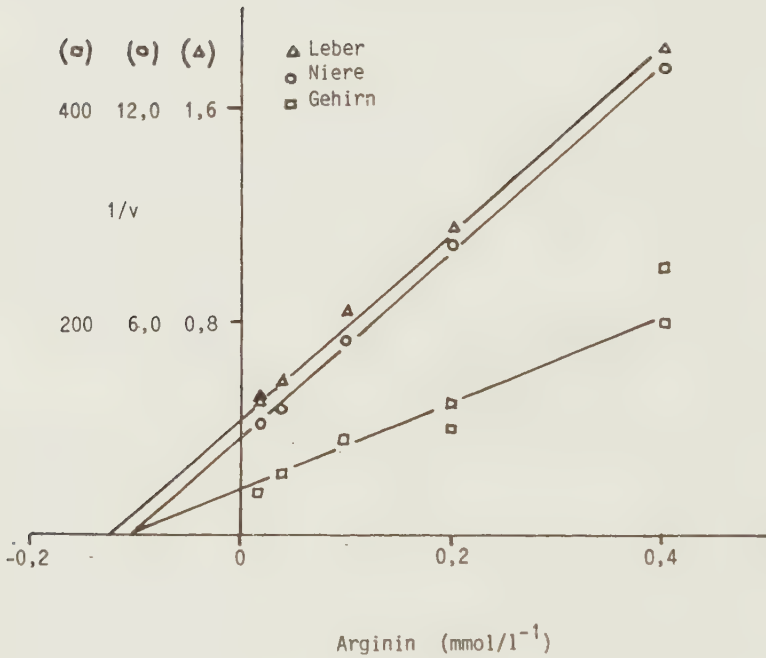


Abb. 15: Lineweaver-Burk-Diagramm für die Kinetik der Arginase in den Organen Leber, Niere und Gehirn (Kontrollen).

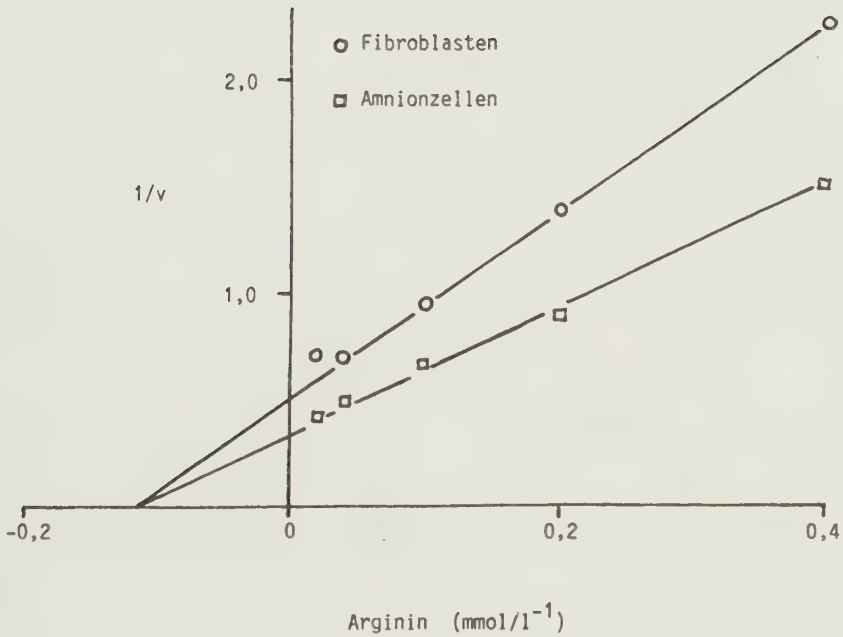


Abb. 16: Lineweaver-Burk-Diagramm für die Kinetik der Arginase in Fibroblasten und Amnionzellen (Kontrollen).

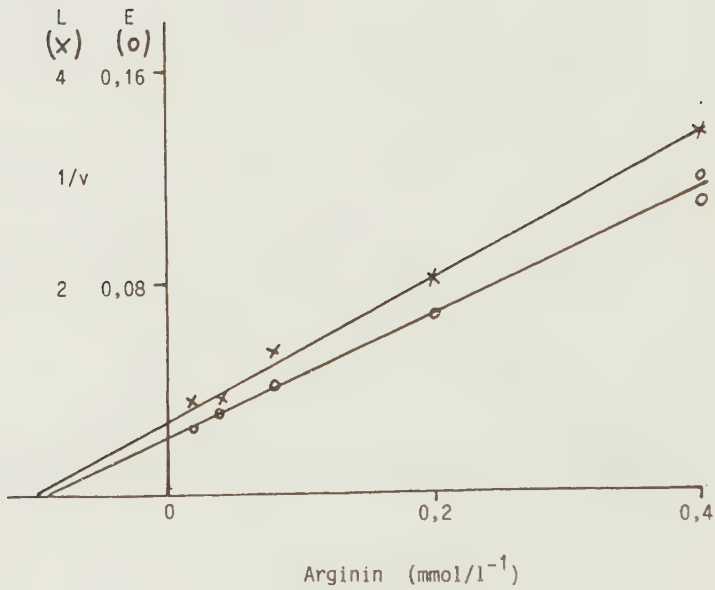


Abb. 17: Lineweaver-Burk-Diagramm für die Kinetik der Arginase in Erythrozyten (E) und Leukozyten (L) (Kontrollen).

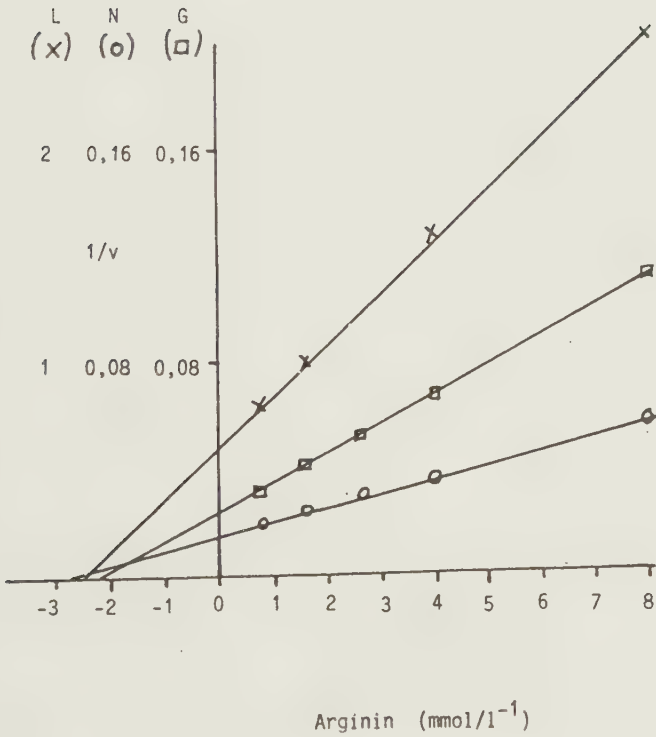


Abb. 18: Lineweaver-Burk-Diagramm für die Kinetik der Argininosuccinase in den Organen Leber (L) , Niere (N) und Gehirn (G). (Kontrollen)

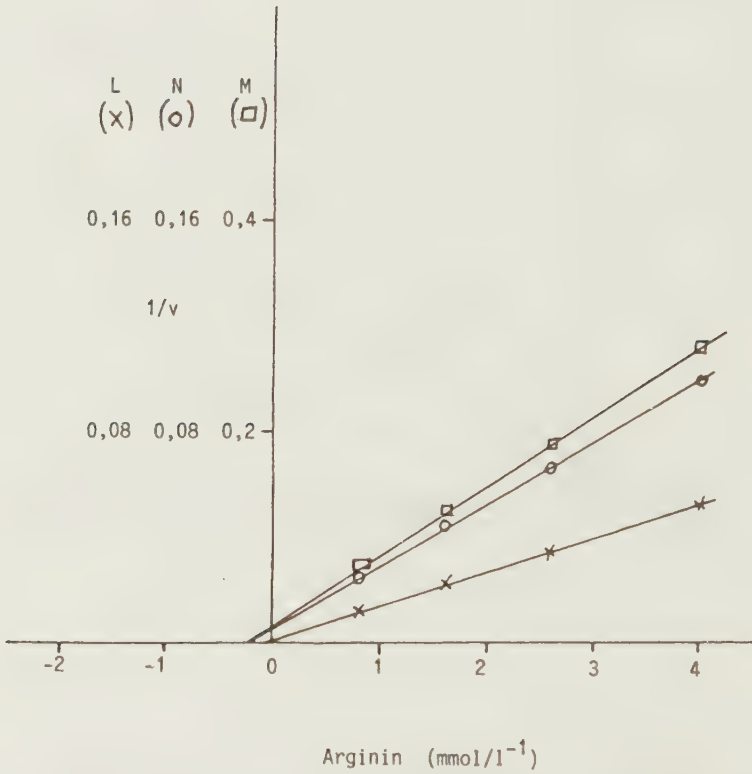


Abb. 19: Lineweaver-Burk-Diagramm für die Kinetik der Argininosuccinase in den Organen Leber (L) , Niere (N) und Milz (M) (Patient 2)

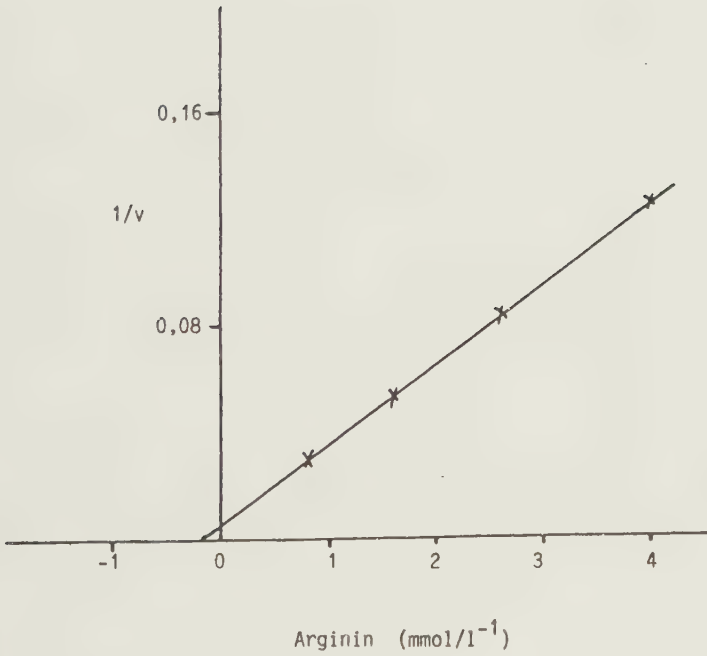


Abb. 20: Lineweaver-Burk-Diagramm für die Kinetik der Argininosuccinase im Duodenum (Patient 2)

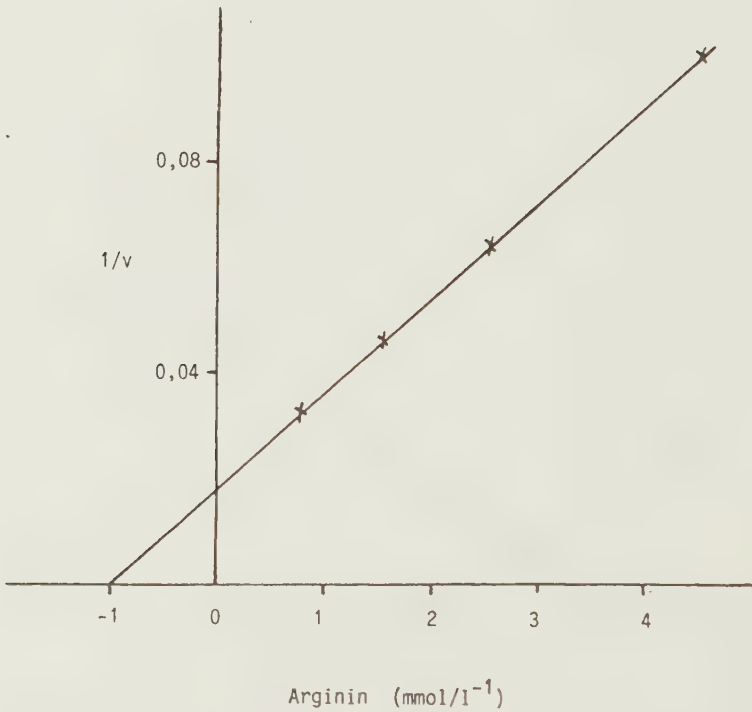


Abb. 21: Lineweaver-Burk-Diagramm für die Kinetik der Argininosuccinase in Erythrozyten (Kontrollen)

6. DISKUSSION

6.1 Testansatz

Absicht dieser Arbeit war es, eine neue Meßmethode für Arginase und Argininosuccinase vorzustellen und Vergleiche zu bisherigen Methoden zu ziehen.

Frühere Autoren benutzten zunächst allgemeine Verfahren wie die Hochspannungselektrophorese zum Screening von Aminosäuren (87), spectrophotometrische Messungen (18), automatische Aminosäurenanalyzer (4) sowie Papier- und Säulenchromatographie (3,12,19,27,28,36,54,70,81).

Einige Autoren (11,26,55,62) verwandten die Methode nach Brown und Cohen (18). Dabei wird Urease zum Testansatz zugegeben, um den entstehenden Ammoniak photometrisch zu messen.

Im Mittelpunkt aller klinisch-chemischen Techniken stand jedoch die Methode nach Tomlinson und Westall (83). Der grundlegende Gedanke dieses Tests bestand in der Tatsache, daß der Reaktionsschritt von Argininosuccinat zu Fumarat und Arginin im Harnstoffzyklus reversibel ist. Dadurch war es den Autoren möglich, nicht nur die Aktivität der Arginase, sondern auch der Argininosuccinase zu messen (9,20,21,40,52,61,74,77).

6.1.1 Argininosuccinase-Messung

Bei der Messung der Argininosuccinase-Aktivität in den verschiedenen Geweben benutzten die Autoren (74,83) entweder einen Überschuß an Arginin und Fumarat, um so das entstehende Produkt Argininosuccinat zu messen, oder aber man verwandte in umgekehrter Richtung einen Arginaseüberschuß (58,69,90), um so über die entstandene Harnstoffrate auf die Aktivität der Argininosuccinase rückschließen zu können.

Eine weitere Methode zur Messung der Argininosuccinase-aktivität aus der Literatur ist das Verfahren nach Takahara und Natelson (79), beschrieben von Qureshi et al. (61). Dabei steht die Blockierung der Arginase mit EDTA im Vordergrund, so daß die Argininosuccinase-Aktivität über die Bestimmung des Arginins erfolgen kann. Ein weiterer Abbau des Arginins zu Harnstoff ist hierbei also nicht nötig.

Der vorliegende Test zur Argininosuccinase-messung greift den Gedanken der Arginase-Blockade zwar auf, verwendet aber nicht die Bestimmung des Arginins, sondern die Bestimmung des Argininosuccinats. Damit wird der neue Argininosuccinasetest zu einem Bindeglied zwischen der Methode von Takahara und Natelson einerseits und der Methode von Tomlinson und Westall andererseits.

6.1.2 Arginase-Messung

Auch hier verwendeten frühere Autoren (21,74,77) die Methode nach Tomlinson und Westall. Die zu testende Gewebs-Arginase wurde dabei zusätzlich in $MnCl_2$ und Glycin aktiviert (74). Der entstandene Harnstoff wurde colorimetrisch nach der Methode von Ratner gemessen.

Der vorliegende Arginase-Test folgt in seinem Testansatz diesem Weg.

6.1.3 Die Verwendung des Radioisotopen L-(guanido) ^{14}C -Argininmonohydrochlorid

Entscheidend für die beiden neuen Enzymtestes ist die Verwendung von L-(guanido) ^{14}C -Argininmonohydrochlorid und die Kombination des Testansatzes mit einem säulenchromatographischen Trennverfahren. Die eigentliche Messung und Berechnung wird dadurch unabhängig von colorimetrischen Verfahren, da allein durch die Bestimmung der radioaktiven Harnstoff- bzw. Argininosuccinatmenge eine Aktivitätsberechnung möglich ist.

Radioisotopen zur Aktivitätsmessung von Enzymen des Harnstoffzyklus verwendeten schon eine Reihe früherer Autoren (32,34, 37,42,58,60,65). Zur weiteren Analyse jedoch benutzten sie Verfahren wie NMR-spectrophotometrische Messungen, Aminosäurenanalyzer und Ionenaustauschchromatographie. Lediglich Ratner (65) und Pollitt (60) kombinierten in ihren Enzymtests den Einsatz von Radioisotopen und anschließender säulenchromatographischer Trennung mit Dowex. Diese Kombination greifen die beiden neuen Enzymmeßtests auf, jedoch zusammen mit dem oben beschriebenen Testansatz.

6.2 Arginaseaktivität

Ein Vergleich der ermittelten Meßwerte für Arginase mit entsprechenden Werten aus der Literatur zeigt zum Teil gute Übereinstimmung.

Für Erythrozyten geben die verschiedenen Autoren (21,23,31,48,50,61,77,78,80,81,83) Normalwerte an, die im Bereich von ca. 13.3 - 96.1 $\mu\text{mol/min/g Hb}$ liegen. Unser Test zeigte einen Bereich von $62.2 \pm 28.4 \mu\text{mol/min/g Hb}$.

Die Literaturangabe für Leukozyten (23,90) fand sich im Bereich von 0.8 - 15.3 $\mu\text{mol/hr/mg Protein}$. Dies ist erheblich niedriger als der von uns ermittelte Wert in der Größenordnung von $1.4 \pm 0.69 \mu\text{mol/min/mg Protein}$.

Die verschiedenen Autoren (6,11,23,33,50,55,85,88) gaben für Leber, Niere und Gehirn folgende Zahlen an:

Leber: 0.86 - 9.65 $\mu\text{mol/min/mg Protein}$. Niere: 16.6 - 65.0 $\text{nmol/min/mg Protein}$. Gehirn: 0.13 - 0.18 $\mu\text{mol/min/mg Protein}$. Damit weicht also nur der Wertebereich für die Niere stärker von unserem Ergebnis ab.

Für Fibroblasten waren bei Konarska et al. (42) und Van Elsen und Leroy (84) Werte von 1.7 - 3.0 $\text{nmol/min/mg Protein}$ zu finden. Unser Wert bewegte sich im Bereich von 1.6 - 4.1 $\text{nmol/min/mg Protein}$.

Über Amnionzellen lagen keine vergleichbaren Ergebnisse vor.

Somit war die spezifische Aktivität der Arginase besonders hoch in der Leber (ca. $10 \mu\text{mol/min/mg}$ Protein) und in den Erythrozyten (ca. $60 \mu\text{mol/min/g}$ Hb).

Übereinstimmend mit der Literatur (47,77) war die Arginaseaktivität in den Erythrozyten des Patienten 1 annähernd Null. Cederbaum et al. (23), Michels und Beaudet (50) und Terheggen et al. (81) hingegen fanden in den Erythrozyten ihrer Patienten immerhin noch eine Restaktivität von $0.01 - 1.0 \mu\text{mol/min/g}$ Hb. Interessant dabei ist, daß die Arginaseaktivität in den Erythrozyten dieser Patienten um so höher war, je höher auch das Lebensalter war, das sie erreicht hatten (2 - 15 Jahre). Unser Patient hingegen war zum Zeitpunkt der Untersuchung nur 6 Monate alt und verstarb bereits im Alter von 11 Monaten. Für die Arginaseaktivität in den Leukozyten ihrer Patienten gaben Cederbaum et al. (23) und Marescau et al. (47) Werte im Bereich von $0 - 1.6 \text{ nmol/min/mg}$ Protein an. Unser Patient 1 zeigte hierbei eine mehr als 10-fach höhere Aktivität ($0.01 - 0.16 \mu\text{mol/min/mg}$ Protein), so wie das auch bei den Kontrollwerten der Fall war.

Diese Meßergebnisse und deren Vergleich mit Meßwerten aus der Literatur lassen somit nur die Schlußfolgerung zu, daß unsere neue Enzymmeßmethode weitaus spezifischer ist als bisherige Verfahrensweisen. Dies gilt um so mehr, als offensichtlich eine positive Korrelation besteht zwischen dem jeweiligen Lebensalter und der Enzymaktivität der Patienten. Unser Patient 1 war jedoch zum Teil erheblich jünger als die Patienten in der Literatur, zeigte aber dennoch - besonders in den Leukozyten - eine höhere Restaktivität als diese. Da auch die Kontrollwerte eine höhere Aktivität aufwiesen als in der Literatur, kann dies nur als Hinweis darauf gewertet werden, daß unsere neue Enzymmeßmethode wesentlich sensitiver arbeitet als bisherige Meßtechniken und auch niedrige Enzymaktivitäten genauer erfaßbar macht.

6.3 Argininosuccinaseaktivität

Die Literaturangaben (20,33,48,56,61,83) für die Erythrozytenaktivität der Argininosuccinase (34 - 130 nmol/min/g Hb) stimmen wiederum gut mit unseren Werten überein.

Darüberhinaus waren in der Literatur (6,16,20,23,33,40,55,58, 85,88) folgende Angaben über die Argininosuccinaseaktivität in Leber, Niere und Gehirn zu finden:

Leber: 6.5 - 63.0 nmol/min/mg Protein.

Niere: 1.5 - 7.8 nmol/min/mg Protein.

Gehirn: 0.7 - 9.3 nmol/min/mg Protein.

Unsere Meßwerte sind mit Ausnahme des Gehirns rund 10 - 20mal höher.

Im Gegensatz zu Berichten (20,33,46,61,83) über Patienten, deren Argininosuccinaseaktivität in den verschiedenen Organen ganz oder teilweise mit Null angegeben wurde, zeigte unser Patient 2 eine Restaktivität von ca. 20 % in der Leber. Auch hier zeigt also unsere neue Enzymmeßmethode eine deutlich höhere Spezifität als bisherige Meßverfahren. Diese Schlußfolgerung wird noch verstärkt, wenn man in Betracht zieht, daß Glick et al. (33) die Argininosuccinatacidurie in drei Verlaufsformen einteilen: In eine neonatale, letale, in eine infantile und eine chronische Verlaufsform. Unser Patient 2 gehörte eindeutig der neonatalen Form an, hatte aber dennoch eine höhere Enzymrestaktivität als vergleichbare Patienten in der Literatur. Ebenso zeigten die Kontrollen mit Ausnahme des Gehirns eine deutlich höhere Enzymaktivität als entsprechende Meßwerte in der Literatur. Auch diese beiden Beobachtungen sprechen für die ausgeprägte Sensitivität der neuen Enzymmeßmethode.

Übereinstimmend mit den Patienten von Carton (20) und Glick (33) war die Argininosuccinaseaktivität in der Niere des Patienten 2 nahezu im Normalbereich.

Die Arginaseaktivität unseres Patienten 2 war ebenso normal wie bei den Argininosuccinase-Patienten früherer Autoren (3,20,33,48,61).

Wie bereits erwähnt, betrug die Ausscheidung an Argininbernsteinsäure im Urin des Patienten 2 insgesamt 5,98 g/l. Die Argininbernsteinsäureausscheidung im Urin von Patienten aus der Literatur bewegte sich im Bereich von 1.26 - 9.0 g/l (27,33,35,45,52,56,61,72,83,89).

6.4 Kinetik

Zwischen der K_m der Arginase und der Argininosuccinase zeigte sich ein deutlicher Unterschied. Im Gegensatz zur K_m der Arginase von 10 mmol/l lag die K_m der Argininosuccinase bei etwa 0.35 - 0.5 mmol/l. Das bedeutet eine verhältnismäßig niedrige Affinität der Arginase im Vergleich zur Argininosuccinase.

Die Affinität der Argininosuccinase beim Patienten 2 war hingegen mit einer K_m von durchschnittlich 5 - 10 mmol/l entsprechend niedrig.

Die ermittelten K_m -Werte für Arginase (10 mmol/l) befinden sich im Bereich entsprechender Zahlenangaben bisheriger Autoren mit 3.4 - 18 mmol/l (2,11,78,84,88).

Für die Michaelis-Menten-Konstante K_m der Argininosuccinase werden in der Literatur (16,32,61,88) Werte von 0.13 - 1.4 mmol/l angeführt. In diesem Bereich liegt auch unser Wert von 0.3 - 0.5 mmol/l.

Außerdem wird von Qureshi et al. (61) über Patienten berichtet, die bei einem Defekt der Argininosuccinase K_m -Werte von 0.09 - 0.18 mmol/l aufwiesen.

Dies steht ganz im Gegensatz zu unserem Patienten 2, der stark erhöhte K_m -Werte zeigte: K_m von 3.5 - 10 mmol/l.

Für Erythrozyten-Argininosuccinase wurde in der Literatur von Qureshi et al. (61) als Normalwert eine v_{max} von 5.8 $\mu\text{mol/hr/g}$ Hb angegeben. Unsere normalen Erythrozyten ergaben eine v_{max} von ca. 20 $\mu\text{mol/hr/g}$ Hb, also ein 3-4-fach höheres Ergebnis.

6.5 Anwendung der entwickelten Enzymmeßmethoden in der pränatalen Diagnostik

Der Einsatz der Enzymteste in der pränatalen Diagnostik ist im Prinzip möglich.

Konarska et al. (42) und Van Elsen und Leroy (84) jedoch stellten in ihren Enzymaktivitätsmessungen fest, daß die Arginaseaktivität von Patienten-Fibroblasten sich nicht unterscheidet von der Arginaseaktivität in normalen Fibroblasten. Lediglich Rogers et al. (67) und Cederbaum und Spector (22) fanden keine Arginaseaktivität in Patienten-Fibroblasten. Spector et al. (78) empfehlen eine Aktivitätsmessung der Arginase in fetalen Erythrozyten.

Ähnlich erscheint die Problematik bei der Argininosuccinase-messung. Bisher haben sich eine Reihe von Autoren mit der Argininosuccinasebestimmung in Amnionzellen und Fibroblasten befaßt (29,34,36,37,58,73,75). Die Meßergebnisse erscheinen jedoch in ihrer Auswirkung für die pränatale Diagnostik als unsicher.

Dafür gibt es mehrere Gründe:

Zum einen kann eine Unterscheidung zwischen Gesunden und Kranken schwierig sein, weil die Meßaktivitäten in Fibroblasten und Amnionzellen bei beiden Meßkollektiven eng beieinander liegen können. Dies gilt ganz besonders für heterozygote Träger der Erkrankung. Lediglich Jacoby et al. (37), Perry et al. (58) und Shih et al. (73,75) konnten bisher einen deutlichen Aktivitätsunterschied zwischen Fibroblasten Gesunder und Erkrankter nachweisen.

Zum anderen ist es noch umstritten, ob Patienten mit einer Argininosuccinacidurie stets in allen Geweben einen Enzymdefekt aufweisen (51). Es gibt vielmehr Beobachtungen (33,58,60), nach denen Patienten zwar einen Enzymdefekt in einem bestimmten Organ haben, dafür aber eine normale Aktivität in anderen Geweben. Es sind dies meist solche, die ohnehin nur eine geringe Enzymaktivität besitzen wie Gehirngewebe, Fibroblasten und Amnionzellen.

Bondy und Rosenberg (13) stellten deshalb die Hypothese auf, daß die Argininosuccinase von mehreren Genloci codiert wird. Die gleiche Überlegung stellte Ratner (66) für die Arginase an.

Ebenso liegen Veröffentlichungen vor, in denen die Frage aufgeworfen wird, ob die beiden Enzyme in den verschiedenen Organen jeweils identisch sind, oder ob es sich vielmehr um Isoenzyme handelt (11,16,42,58,60,66,84,86).

6.6 Therapie von Hyperargininämie und Argininosuccinat-acidurie

Zur Beseitigung der toxischen Hyperammonämie, die bei Hyperargininämie und Argininosuccinataacidurie auftritt, machen verschiedene Autoren (5,7,8,19,24,26,30,38,49,57,63,71,80,81,85,87) übereinstimmend folgende therapeutischen Vorschläge:

- a) Proteinarme Diät (ca. 1 - 2 g Protein/kg KG/die)
- b) Peritonealdialyse und Austauschtransfusion
- c) Natrium-Benzoesäuregabe (ca. 250 mg/kg KG/die).

Darüberhinaus unternahmen einige Autoren folgende therapeutische Schritte:

Wallis et al. (87) versuchten ohne Erfolg die Gabe von Corticosteroiden. Böhles et al. (12) gaben essentielle Aminosäuren und deren Ketoanalogue. Mit Hilfe der Ketoanalogue versuchten die Autoren Aminogruppen abzufangen, um so die Zufuhr von Aminosäuren und Proteinen einsparen zu können. Diese Form der Therapie führte zu einer deutlichen Besserung in der klinischen Symptomatik der Patienten.

Levin et al. (44,45) verbesserten den klinischen Zustand ihrer Patienten durch die Verabreichung essentieller Aminosäuren im Rahmen einer proteinarmen Diät.

Während Snyderman et al. (76) Arginin als nicht essentiell für das Wachstum gesunder Kinder erkannten, gaben Kline et al. (41) und Matalon et al. (49) Arginin als essentielle Aminosäure bei Harnstoffzyklusdefekten und im besonderen bei der Argininosuccinataacidurie.

Diese Auffassung äußert auch Colombo (25). Er befürchtet bei mangelnder Argininzufuhr sogar eine erhebliche Verschlechterung im Zustandsbild der Patienten mit Argininbernsteinsäurekrankheit. Lehninger (43) macht dies ebenfalls noch einmal deutlich, wenn er vor Augen führt, daß die mit der Nahrung zugeführte Aminosäure Arginin im Organismus verhältnismäßig rasch zu Harnstoff abgebaut wird. Bei den Patienten mit einem Defekt der Argininosuccinase kommt schließlich noch hinzu, daß durch den Harnstoffzyklus auch kein Arginin aus Argininosuccinat gebildet werden kann. Es steht diesen Patienten somit kaum Arginin für den Aufbau körpereigener Proteine zur Verfügung. Bei unserem Patienten 1 führte die Verordnung einer proteinarmen Diät unter Verwendung von essentiellen Aminosäuren zu einer Verbesserung der klinischen Symptomatik als auch zu einer Absenkung des Blutammoniakspiegels und der Plasmaargininkonzentration. Der bereits erworbene ZNS-Schaden war allerdings nicht mehr zu beheben.

Patient 2 hingegen verstarb im Alter von wenigen Tagen, nachdem Austauschtransfusionen nicht in der Lage waren, die Hyperammonämie zu mildern.

7. ZUSAMMENFASSUNG

Es wurden zwei Säuglinge mit ausgeprägter Hyperammonämie unterschiedlicher Genese untersucht. Die Patienten zeigten jeweils einen Enzymdefekt im Harnstoffzyklus, nämlich eine Hyperargininämie (Patient 1) bzw. eine Argininosuccinacidurie (Patient 2).

Im Mittelpunkt der klinischen Symptomatik dieser Patienten standen Krampfanfälle und Schockzustände. Beide starben noch in der Säuglingszeit, Patient 1 mit 11 Monaten, Patient 2 bereits im Alter von 8 Tagen.

Für die enzymatische Diagnostik dieser Harnstoffzyklusdefekte wurden zwei neue radiometrische Testverfahren entwickelt. Die Methoden beruhen auf der Benutzung von L-(guanido)¹⁴C-Argininmonohydrochlorid und einem säulenchromatographischen Trennverfahren mit Dowex AG 50 Wx8. Aufgrund der hohen Spezifität der Methoden ist eine sichere enzymatische Diagnostik beider Stoffwechselstörungen aus verschiedenen Geweben, zum Teil aus Blutzellen, möglich. Darüberhinaus wurden verschiedene Organe verwendet, um die unterschiedlichen Enzymkinetiken zu ermitteln. Eine Anwendung dieser Methoden in der pränatalen Diagnostik erscheint im Prinzip möglich, jedoch konnten bisher mit anderen, weniger sensitiven Methoden kaum Unterschiede zwischen gesunden und kranken Feten gefunden werden.

Die Ergebnisse der Arginasemessung in verschiedenen Geweben stimmen mit anderen Werten in der Literatur überein. Während Erythrozyten und Leukozyten von Patient 1 nahezu keine Aktivität zeigten, waren bei den Kontrollpersonen die Enzymaktivitäten in Leber (9 $\mu\text{mol/min/mg Protein}$) und Erythrozyten (60 $\mu\text{mol/min/g Hb}$) am höchsten. An zweiter Stelle folgten mit etwa gleich hohen Meßwerten die Niere (1 $\mu\text{mol/min/mg Protein}$) und die Leukozyten (1.4 $\mu\text{mol/min/mg Protein}$). Die geringste Aktivität zeigten das Gehirn (0.1 $\mu\text{mol/min/mg Protein}$) sowie Fibroblasten und Amnionzellen (1 - 4 $\text{nmol/min/mg Protein}$).

Bei den Leukozyten scheint unsere Methode empfindlicher zu sein als bisherige Messungen, denn sowohl die Normalwerte als auch die Patientenwerte waren etwa 10mal höher als in der Literatur.

Auch unsere Argininosuccinase-messung scheint insgesamt spezifischer zu sein als bisherige Methoden. Die Meßwerte sind im Durchschnitt rund 10 - 20mal höher als entsprechende Angaben aus früheren Veröffentlichungen. Wiederum zeigten die Leber (300 nmol/min/mg Protein) und die Erythrozyten (118 nmol/min/g Hb) der Kontrollen die höchste Enzymaktivität, gefolgt von Niere (35 nmol/min/mg Protein) und Gehirn (9 nmol/min/mg Protein).

Meßproben von Patient 2 zeigten eine hohe Restaktivität, die bei der Leber mit 20 % am geringsten war.

Bezüglich der Kinetik ergaben sich bei beiden Enzymen praktisch keine Unterschiede zu bisherigen Veröffentlichungen. Die Affinität der Argininosuccinase ($K_m = 0.3 - 0.5 \text{ mmol/l}$) ist offensichtlich rund 20mal höher als die Affinität der Arginase ($K_m = 10 \text{ mmol/l}$). Bei Patient 2 waren die Affinitätsverhältnisse nahezu umgekehrt. Die Argininosuccinase zeigte hier eine ähnlich niedrige Affinität wie die Arginase. Die Arginasekinetik des Patienten 1 hingegen unterschied sich nicht von der Arginasekinetik der Kontrollen. Als Therapiemöglichkeit beider Enzymdefekte stehen im wesentlichen die Einschränkung der Proteinzufuhr sowie Peritonealdialyse und Austauschtransfusion zur Verfügung.

8. LITERATUR

- (1) J.K. Allan, D.C. Cusworth, C.E. Dent, V.K. Wilson: A disease, probably hereditary, characterized by severe mental deficiency and a gross abnormality of amino acid metabolism. Lancet 1, (1958) 182 -187
- (2) R. Aguirre, V. Kasche: Catalytically active monomer forms of immobilized arginase. Eur. J. Biochem. 130, 373 - 381 (1983)
- (3) D.A. Applegarth, A.G.F. Davidson, T.L. Perry, S. Poon, J.U. Crichton, D.F. Hardwick: Argininosuccinic acidemia in a healthy infant detected by a urine screening program. Clin. Chem. 21, 950 - 951 (1975)
- (4) M.D. Armstrong, K.N. Yates, M.G. Stemmerman: An occurrence of argininosuccinic aciduria. Pediatrics 33, 280 - 283 (1964)
- (5) C. Bachmann, J.P. Colombo: Hyperammonämie: Ein Vorschlag für das diagnostische und therapeutische Vorgehen. Pädiatrie und Pädologie 17, 141 - 148 (1982)
- (6) R.A. Ballard, B. Vinocur, J.W. Reynolds, R.P. Wennberg, A. Merrit, L. Sweetman, W.L. Nyhan: Transient hyperammonemia of the preterm infant. N. Engl. J. Med. 299, 920 - 925 (1978)
- (7) M.L. Batshaw, S.W. Brusilow: Treatment of hyperammonemic coma caused by inborn errors of urea synthesis. J. Pediatr. 97, 893 - 900 (1980)
- (8) M.L. Batshaw, G.H. Thomas, S.W. Brusilow: New approaches to the diagnosis and treatment of inborn errors of urea synthesis. Pediatrics 68, 290 - 297 (1981)

- (9) R. Baumgartner, S. Scheidegger, G. Stalder, A. Hottinger: Argininbernsteinsäure-Krankheit des Neugeborenen mit letalem Verlauf. *Helv. Paediatr. Acta* 1, 77 - 106 (1968)
- (10) I.R. Beddis, E.A. Hughes, E. Rosser, J.C.B. Fenton: Plasma ammonia levels in newborn infants admitted to an intensive care baby unit. *Arch. Dis. Child.* 55, 516 - 520 (1980)
- (11) J. Berüter, J.P. Colombo, C. Bachmann: Purification and properties of arginase from human liver and erythrocytes. *Biochem. J.* 175, 449 - 454 (1978)
- (12) H. Böhles, H. Heid, D. Harms, D. Schmid, W. Fekl: Argininosuccinic aciduria: Metabolic studies and effects of treatment with keto-analogues of essential amino acids. *Eur. J. Pediatr.* 128, 225 - 233 (1978)
- (13) Ph.K. Bondy, L.E. Rosenberg: Disorders of intermediary metabolism. In: Bondy, Rosenberg: Metabolic control and disease, 8th Edn, W.B. Saunders Company Philadelphia, London, Toronto 1980, 690 - 691
- (14) H.J. Bremer, M. Duran, J. Kamerling, H. Przyrembel, S.K. Wadman: Argininosuccinic aciduria - hyperargininemia. In: H.J. Bremer, M. Duran, J. Kamerling, H. Przyrembel, S.K. Wadman: Disturbances of amino acid metabolism: Clinical chemistry and diagnosis, Urban & Schwarzenberg 1981, 233 - 294
- (15) H.J. Bremer, M. Duran, J. Kamerling, H. Przyrembel, S.K. Wadman: Argininosuccinic aciduria - hyperargininemia. In: H.J. Bremer, M. Duran, J. Kamerling, H. Przyrembel, S.K. Wadman: Disturbances of amino acid metabolism: Clinical chemistry and diagnosis, Urban & Schwarzenberg 1981, 207

- (16) W.E.O'Brien, R.H. Barr: Argininosuccinate lyase: Purification and characterization from human liver. *Biochemistry* 20, 2056 - 2060 (1981)
- (17) J. Brodehl, K. Gellissen: Endogenous renal transport of free amino acids in infancy and childhood. *Pediatrics* 42, 395 - 404 (1968)
- (18) G.W. Brown, P.P. Cohen: Comparative biochemistry of urea synthesis. Methods for the quantitative assay of urea cycle enzymes in liver. *J. Biol. Chem.* 234, 1769 - 1774 (1959)
- (19) S.W. Brusilow, M.L. Batshaw: Arginine therapy of argininosuccinase deficiency. *Lancet* 1, (1979) 124 - 127
- (20) D. Carton, F.DE Schrijver, J. Kint, J. Van Durme, C. Hooft: Argininosuccinic aciduria-neonatal variant with rapid fatal course. *Acta Paediat. Scand.* 58, 528 - 534 (1969)
- (21) S.D. Cederbaum, K.N.F. Shaw, M. Valente: Hyperargininemia. *J. Pediatr.* 90, 569 - 573 (1977)
- (22) S.C. Cederbaum, E.B. Spector: Arginase activity in fibroblasts. *Am. J. Hum. Genet.* 30, 91 - 92 (1978)
- (23) S.D. Cederbaum, K.N.F. Shaw, M.A. Verity, P.J. Snodgrass, G.I. Sugarman: Hyperargininemia with arginase deficiency. *Pediatr. Res.* 13, 827 - 833 (1979)
- (24) F.S. Collins, G.K. Summer, R.P. Schwartz, J.C. Parke: Neonatal argininosuccinic aciduria - survival after early diagnosis and dietary management. *J. Pediatr.* 96, 429 - 431 (1980)
- (25) J.P. Colombo: Congenital disorders of the urea cycle and ammonia detoxication. In: J.P. Colombo: Monographs in pediatrics. Vol 1, Karger Basel 1971, 77 - 78

- (26) L.M. Corbeel, J.P. Colombo, M. Van Sande, A. Weber: Periodic attacks of lethargy in a baby with ammonia intoxication due to a congenital defect in ureogenesis. Arch. Dis. Child. 44, 681 - 687 (1969)
- (27) M.E. Coryell, W.K. Hall, T.G. Thevaos, D.A. Welter, A.J. Gatz, B.F. Horton, B.D. Sisson, J.W. Looper, R.T. Farrow: A familial study of a human enzyme defect, argininosuccinic aciduria. Biochem. Biophys. Res. Commun. 14, 307 - 312 (1964)
- (28) D.C. Cusworth, R.G. Westall: Determination of argininosuccinic acid by ion-exchange chromatography. Nature 192, 555 - 556 (1961)
- (29) L.D. Fleisher, D.K. Rassin, R.H. Desnick, H.R. Salwen, P. Rogers, M. Bean, G.E. Gaull: Argininosuccinic aciduria: prenatal studies in a family at risk. Am. J. Hum. Genet. 31, 439 (1979)
- (30) J.M. Freeman, J.F. Nicholson, W.S. Masland, L.P. Rowland, S. Carter: Ammonia intoxication due to a congenital defect in urea synthesis. J. Pediatr. 65, 1039 - 1040 (1964)
- (31) K. Fukumoto, I. Karai, Y. Nishikawa, S. Horiguchi: Erythrocyte arginase activity as an indicator of lead exposure. British Journal of industrial medicine 40, 106 - 110 (1983)
- (32) L.J. Garrard, J.M. Mathis, F.M. Raushel: Substrate-induced inactivation of argininosuccinate lyase by monofluorofumarate and difluorofumarate. Biochemistry 22, 3729 - 3735 (1983)
- (33) N.R. Glick, P.J. Snodgrass, I.A. Schafer: Neonatal argininosuccinic aciduria with normal brain and kidney but absent liver argininosuccinate lyase activity. Am. J. Hum. Genet. 28, 22 - 30 (1976)

- (34) S.I. Goodman, J.W. Mace, B. Turner, W.J. Garrett:
Antenatal diagnosis of argininosuccinic aciduria. Clin.
Genet. 4, 236 - 240 (1973)
- (35) L. Hambræus, L.I. Hardell, O. Westphal, R. Lorentsson,
G. Hjorth: Argininosuccinic aciduria. Acta Paediatr.
Scand. 63, 525 - 536 (1974)
- (36) P.L. Hartlage, M.E. Coryell, W.K. Hall, D.A. Hahn:
Argininosuccinic aciduria: Perinatal diagnosis and
early dietary management. J. Pediatr. 85, 86 - 88 (1974)
- (37) L.B. Jacoby, J.W. Littlefield, A. Milunsky, V.E. Shih,
R.S. Wilroy: A microassay for argininosuccinase in
cultured cells. Am. J. Hum. Genet. 24, 321 - 324 (1972)
- (38) E.G. John, R. Bhat, D. Vidyasagar: Neonatal survival
after early diagnosis and treatment of argininosuccinic
aciduria. J. Pediatr. 97, 867 - 868 (1980)
- (39) R.L. Joseph, E. Baldwin, D.C. Watts: Studies on
carbamoyl phosphate -L-ornithine carbamoyltransferase
from ox liver. Biochem. J. 87, 409 - 416 (1963)
- (40) J. Kint, D. Carton: Deficient argininosuccinase activity
in brain in argininosuccinicaciduria. Lancet 2, (1968)
635
- (41) J.J. Kline, G. Hug, W.K. Schubert, H. Berry: Arginine
deficiency syndrome. Am. J. Dis. Child. 135, 437 - 442
(1981)
- (42) L. Konarska, U. Wiesmann, R.v. Fellenberg, J.P. Colombo:
Isoenzyme pattern and immunological properties of
arginase in normal and hyperargininemia fibroblasts.
Enzyme 29, 44 - 53 (1983)

- (43) A.T. Lehninger: The biosynthesis of amino acids and some derivatives. In: A.T. Lehninger: Biochemistry. The molecular basis of cell structure and function. 2nd Edn. Mc Graw-Hill, New York 1975, 703 - 705
- (44) B. Levin, A. Russell: Treatment of hyperammonemia. Am. J. Dis. Child. 113, 142 - 145 (1967)
- (45) B. Levin, H.M.M. Mackay, V.G. Oberholzer: Argininosuccinic aciduria: An inborn error of amino acid metabolism. Arch. Dis. Child. 36, 622 - 632 (1961)
- (46) B. Levin: Argininosuccinic aciduria. Am. J. Dis. Child. 113, 162 - 165 (1967)
- (47) B. Marescau, J. Pintens, A. Lowenthal, H.G. Terheggen, K. Adriaenssens: Arginase and free amino acids in hyperargininemia: Leukocyte arginine as a diagnostic parameter for heterozygotes. J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 17, 211 - 217 (1979)
- (48) D. Margalith, J.U. Crichton, L. Wong, A.G.F. Davidson, D.A. Applegarth, J.R. Toone: Argininosuccinic aciduria: A developmental and biochemical case study. Journal of the Neurological Sciences 60, 217 - 233 (1983)
- (49) R. Matalon, K. Michals, S. Gross, M.L. Batshaw, S.W. Brusilow: Diagnosis, treatment and follow up of neonatal argininosuccinic acidemia. Pediatr. Res. 15, 636 (1981)
- (50) V.V. Michels, A.L. Beaudet: Arginase deficiency in multiple tissues in argininemia. Clin. Genet. 13, 61 - 67 (1978)
- (51) G. Morrow, V. Auerbach: Urea cycle. In: Nelson von R.E. Behrman, V.C. Vaughan (Hrsg): Textbook of pediatrics. W.B. Saunders Company, Philadelphia, London, Toronto 1983, 439 - 441

- (52) H.W. Moser, M.L. Efron, H. Brown, R. Diamond, C.G. Neumann: Argininosuccinic aciduria: Report of two new cases and demonstration of intermittent elevation of blood ammonia. *Am. J. Med.* 42, 9 - 26 (1967)
- (53) W.C. McMurray, J.C. Rathbun, F. Mohyuddin, S.J. Koegler: Citrullinuria. *Pediatrics* 32, 347 - 357 (1963)
- (54) E.W. Naylor: Newborn screening for urea cycle disorders. *Pediatrics* 68, 453 - 457 (1981)
- (55) K. Oyanagi, K. Nakamura, H. Sogawa, H. Tsukazaki, R. Minami, T. Nakao: A study of urea-synthesizing enzymes in prenatal and postnatal human liver. *Pediat. Res.* 14, 236 - 241 (1980)
- (56) T. Palmer, V.G. Oberholzer, B. Levin, E.A. Burgess: Urinary excretion of argininosuccinic acid. *Clin. Chim. Acta* 47, 443 - 448 (1973)
- (57) T. Palmer, V.G. Oberholzer, E.A. Burgess, L.J. Butler, B. Levin: Hyperammonemia in 20 families. Biochemical and genetical survey, including investigations in 3 new families. *Arch. Dis. Child.* 49, 443 - 449 (1974)
- (58) T.L. Perry, M.L.K. Wirtz, N.G. Kennaway, Y.E. Hsia, F.C. Atienza, H.S. Uemura: Amino acid and enzyme studies of brain and other tissues in an infant with argininosuccinic aciduria. *Clin. Chim. Acta* 105, 257 - 267 (1980)
- (59) L. Pollack, Th. Hansen, J. Adams, A. Beaudet: Transient hyperammonemia in term and preterm infants. *Pediat. Res.* 12, 532 (1978)

- (60) R.J. Pollitt: Argininosuccinate lyase levels in blood, liver and cultured fibroblasts of a patient with argininosuccinic aciduria. Clin. Chim. Acta 46, 33 - 37 (1973)

- (61) I.A. Qureshi, J. Letarte, R. Quellet, B. Lemieux: Enzymologic and metabolic studies in two families affected by argininosuccinic aciduria. Pediat. Res. 12, 256 - 262 (1978)

- (62) N.C.R. R  ih  , J. Suihkonen: Development of urea-synthesizing enzymes in human liver. Acta Paediat. Scand. 57, 121 - 124 (1968)

- (63) M.A. Rathbun, M.F. Bryson, G.J. Myers & V. Shih: Argininosuccinic aciduria: A survivor of the neonatal variant. Pediat. Res. 11, 462 (1977)

- (64) S. Ratner, B. Petrack: The mechanism of arginine synthesis from citrulline in kidney. J. Biol. Chem. 200, 175 - 185 (1953)

- (65) S. Ratner: A radiochemical assay for argininosuccinate synthetase with (U-¹⁴C)aspartate. Analytical Biochemistry 135, 479 - 488 (1983)

- (66) S. Ratner: Enzymes of arginine and urea synthesis. Adv. Enzymol. 39, 27 - 47 (1973)

- (67) S. Rogers, A. Lowenthal, H.G. Terheggen, J.P. Colombo: Induction of arginase activity with the Shope papilloma virus in tissue culture cells from an argininemic patient. J. exp. Med. 137, 1091 - 1096 (1973)

- (68) A. Russell, B. Levin, V.G. Oberholzer, L. Sinclair: Hyperammonemia. A new instance of an inborn enzymatic defect of the biosynthesis of urea. *Lancet* 2, (1962) 699- 700
- (69) B. Sadasivudu, T.I. Rao: Studies on functional and metabolic role of urea cycle intermediates in brain. *J. Neurochem.* 27, 785 - 794 (1976)
- (70) K. Schreier, G. Leuchte: Argininbernsteinsäure-Krankheit. *Dtsch. med. Wschr.* 19, 864 - 865 (1965)
- (71) K. Schreier: Angeborene Störungen im Harnstoffzyklus. *Dtsch. med. Wschr.* 19, 888 - 889 (1965)
- (72) Ch. Scriver, L.E. Rosenberg: Urea cycle and ammonia. In: Amino acid metabolism and its disorders. Scriver and Rosenberg (Hrsg) W.B. Saunders Company Philadelphia, London, Toronto 1973, 234 - 249
- (73) V. Shih, J.W. Littlefield: Argininosuccinase activity in amniotic-fluid cells. *Lancet* 2, (1970) 45
- (74) V.E. Shih, T.C. Jones, H.L. Levy, Ph.M. Madigan: Arginase deficiency in macaca fascicularis. I. Arginase activity and arginine concentration in erythrocytes and in liver. *Pediat. Res.* 6, 548 - 551 (1972)
- (75) V.E. Shih, J.W. Littlefield, H.W. Moser: Argininosuccinase deficiency in fibroblasts cultured from patients with argininosuccinic-aciduria. *Biochem. Genet.* 3, 81 - 83 (1969)
- (76) S.E. Snyderman, A. Boyer, L.E. Holt: The arginine requirement of the infant. *Am. J. Dis. Child.* 97, 192 - 195 (1959)

- (77) S.E. Snyderman, C. Sansaricq, W.J. Chen, P.M. Norton, S.V. Phansalkar: Argininemia. J. Pediatr. 90, 563 - 568 (1977)
- (78) E.B. Spector, M. Kiernan, B. Bernard, S.D. Cederbaum: Properties of fetal and adult red blood cell arginase: A possible prenatal diagnostic test for arginase deficiency. Am. J. Hum. Genet. 32, 79 - 87 (1980)
- (79) K. Takahara, S. Natelson: Argininosuccinic acid lyase in human erythrocytes and plasma in health and disease. The American Journal of Clinical Pathology 47, 693 - 703 (1967)
- (80) H.G. Terheggen, A. Schenk, A. Lowenthal, M. van Sande, J.P. Colombo: Argininemia with arginase deficiency. Lancet 2, (1969) 748 - 749
- (81) H.G. Terheggen, A. Lowenthal, F. Lavinha, J.P. Colombo: Familial hyperargininemia. Arch. Dis. Child. 50, 57 - 62 (1975)
- (82) S.E. Tollefsen, E.R.B. McCabe, S.I. Goodman: Neonatal hyperammonemia. Pediatrics 65, 1197 - 1198 (1980)
- (83) S. Tomlinson, R.G. Westall: Argininosuccinic aciduria. Argininosuccinase and arginase in human blood cells. Clin. Sci. 26, 261 - 269 (1964)
- (84) A.F. Van Elsen, J.G. Leroy: Human hyperargininemia: A mutation not expressed in skin fibroblasts? Am. J. Hum. Genet. 29, 350 - 355 (1977)
- (85) C. Van Der Heiden, L.J. Gerards, J.P.G.M. van Biervliet, J. Desplanque, P.K. de Bree, F.J. van Sprang, S.K. Wadman: Lethal neonatal argininosuccinate lyase deficiency in four children from one sibship. Helv. Paediat. Acta 31, 407 - 417 (1976)

- (86) G. Venkatakrishnan, S.R.R. Reddy: A comparative polyacrylamide gel electrophoretic study of arginase in vertebrate tissues. *Enzyme* 29, 145 - 152 (1983)

- (87) K. Wallis, S. Beer, J. Fischl: A family affected by argininosuccinic aciduria. *Helv. Paediat. Acta* 4, 339 - 348 (1963)

- (88) M. Walser: Urea cycle disorders and other hereditary hyperammonemic syndromes. In: J.B. Stanbury, J.B. Wyngaarden, D.S. Fredrickson, J.L. Goldstein, M.S. Brown: *The metabolic basis of inherited disease*. 5th Edn. Mc Graw-Hill, New York 1983, 402 - 438

- (89) R.G. Westall: Argininosuccinic aciduria: Identification and reactions of the abnormal metabolite in a newly described form of mental disease, with some preliminary metabolic studies. *Biochem. J.* 77, 135 - 144 (1960)

- (90) D.M. Wolfe, P.D. Gatfield: Leukocyte urea cycle enzymes in hyperammonemia. *Pediat. Res.* 9, 531 - 535 (1975)

9. LEBENS LAUF

Name: Schaller, Rainer Georg
Geburtsdatum: 27. März 1960
Eltern: Georg und Therese Schaller, geb. Huber
Staatsangehörigkeit: deutsch

Schul Ausbildung:

Grundschule: 1966 bis 1970 in Ergolding/Landshut
Gymnasium: 1970 bis 1979 am Hans-Carossa-Gymnasium
in Landshut. Abitur: im Juni 1979

Medizinstudium:

Beginn: im Wintersemester 1979/80 an der Ludwig-
Maximilians-Universität München

Ärztliche Vorprüfung: März 1982

Experimentelle

Dissertation: Beginn Frühjahr (April) 1983 an
der Kinderklinik der Universität München

Ärztliche Prüfung

I. Abschnitt: März 1983

Ärztliche Prüfung

II. Abschnitt: März 1985

Praktisches Jahr: Beginn im April 1985 an der Kinderklinik der
Universität München

